

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna



## **DOTTORATO DI RICERCA**

### **SCIENZE DELLO SVILUPPO E DEL MOVIMENTO UMANO Sviluppo e Riproduzione umane**

Ciclo XXIII

Settore scientifico disciplinari di afferenza: BIO/17

*Evidenza del coinvolgimento di geni nell'insorgenza  
delle schisi labio-palatine*

Presentata da: **Dott.ssa Elena Masiero**

Coordinatore Dottorato

**Prof.ssa Elisabetta Caramelli**

Relatore

**Prof. Luca Scapoli**

**Esame finale anno 2011**

# SOMMARIO

<b>SOMMARIO</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUZIONE</b>	<b>3</b>
SVILUPPO DELLA FACCIA	4
SVILUPPO DEL PALATO	7
ALTERAZIONI DELLO SVILUPPO DELLA FACCIA	9
EPIDEMIOLOGIA DELLE SCHISI	12
FATTORI AMBIENTALI	13
LOCİ E GENI	16
SCHISI E SINDROMI	22
MYH14	25
CBS/BHMT	25
LMO4/MKX	28
<b>SCOPO DELLA RICERCA</b>	<b>30</b>
<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>32</b>
POPOLAZIONE DI STUDIO	33
ESTRAZIONE DEL DNA	34
SCELTA DEI MARKERS	35
ANALISI DEI POLIMORFISMI MEDIANTE SONDE FLUORESCENTI	39
ANALISI IN MANUALE	41
<i>Analisi dei polimorfismi mediante enzimi di restrizione</i>	41
SEQUENZIAMENTO	43
ANALISI STATISTICA	43
<i>Equilibrio di Hardy-Weinberg</i>	44
<i>Transmission Disequilibrium Test (TDT)</i>	47
<i>Analisi log-linear</i>	48
<b>RISULTATI</b>	<b>49</b>
<i>GENI RESPONSABILI DI SINDROMI</i>	50
MYH14	51
CBS/ BHMT/ BHMT2	52
MKX/ LMO4	55
<b>DISCUSSIONE</b>	<b>57</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>65</b>

# INTRODUZIONE

## SVILUPPO DELLA FACCIA

La faccia comincia a formarsi alla quarta settimana di sviluppo embrionale, a partire da cinque processi mesodermici detti *processi facciali* (figura 1.1).

I processi facciali costituiscono le pareti dello stomodeo, e sono:

- processo frontale: impari e mediano. Esso è il più voluminoso, è determinato dalla sporgenza del telencefalo e forma il tetto dello stomodeo;
- processi mascellari: sono due simmetrici. Sono delle propaggini dei processi mandibolari e costituiscono le pareti laterali dello stomodeo;
- processi mandibolari: anch'essi in numero pari. Si uniscono lungo la linea mediana per formare il pavimento dello stomodeo.

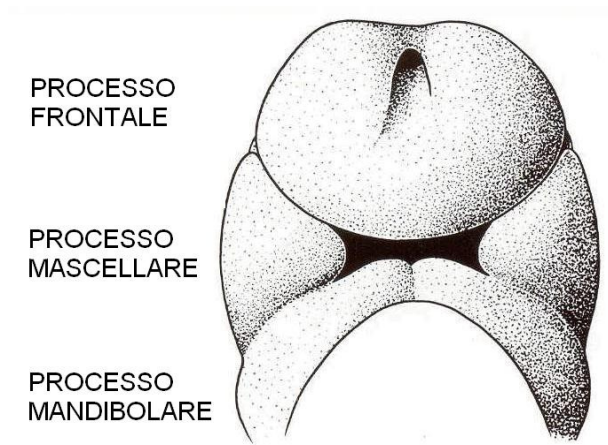


Figura 1.1 La faccia alla IV settimana di sviluppo embrionale. Il processo frontale (in alto), i due processi mascellari (ai lati) e i due processi mandibolari (in basso) delimitano l'apertura della bocca primitiva.

Alla fine della quarta settimana appaiono, sul processo frontale, due inspessimenti dell'ectoderma superficiale: i *placodi olfattivi*. Durante la quinta settimana, il mesoderma che circonda ognuno di essi, prolifera dando luogo a due abbozzi contigui a forma di ferro di cavallo: i *processi nasali mediali e laterali* (figura 1.2).

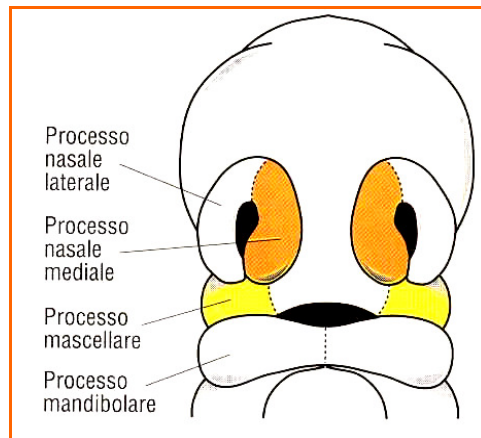


Figura 1.2 La faccia alla V settimana di sviluppo embrionale. In evidenza i processi nasali (in alto), i due processi mascellari (ai lati) e il due processo mandibolare (in basso).

La formazione dei processi nasali trasforma i placodi olfattivi in fossette olfattive, che si aprono all'esterno con le narici.

Successivamente, i processi facciali vanno incontro ad una serie di fusioni, in regioni prestabilite, che conducono allo sviluppo morfologico finale della faccia.

Già alla fine della quarta settimana, i processi mandibolari si fondono medialmente, dando luogo al mento ed all'abbozzo del labbro inferiore.

Alla fine della sesta settimana, i processi nasali mediali migrano verso il centro, dando origine al *massiccio mediano*. Dalla parte superiore di questo

si forma il *setto nasale*, da quella inferiore, il *processo intermascellare* (figura 1.3).

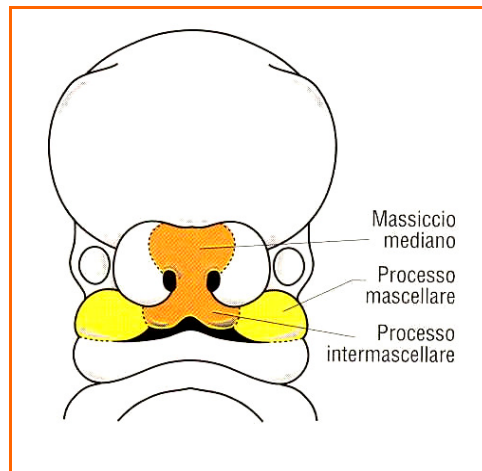


Figura 1.3 La faccia alla fine della VI settimana di sviluppo embrionale. In rilievo la formazione del massiccio mediano (al centro) che da origine al setto nasale e al processo intermascellare(sotto)

Il processo intermascellare origina a sua volta tre strutture:

- una componente labiale, che formerà il filtro del labbro superiore;
- una porzione premascellare della mascella, dove eromperanno i quattro denti incisivi;
- una componente palatina, che formerà il palato primario anteriormente al forame incisivo.

Anche i processi mascellari vanno incontro a diversi gradi di fusione con gli altri processi facciali. Essi si fondono prima di tutto anteriormente con il processo intermascellare, dando origine all'*arco della mascella* e al *labbro superiore*.

Successivamente, i bordi superiori dei processi mascellari si uniscono ai processi naso-laterali, formando i *massicci laterali*, le strutture di base delle guance. In profondità, tale fusione è incompleta e ad entrambi i lati del naso resta un canale pervio, il *dotto naso-lacrimale*, che collega il futuro sacco lacrimale dell'occhio alla cavità nasale.

## SVILUPPO DEL PALATO

Il palato si forma alla quinta settimana di sviluppo embrionale, da due strutture: *palato primario* e *palato secondario*.

Il palato primario separa lo stomodeo dalle fosse nasali primitive ed origina dalla porzione più profonda del segmento intermascellare.

Il palato secondario deriva invece dai processi mascellari ed è formato da due lamine che si estendono dalle pareti di tali processi verso l'interno della bocca, dando origine ai *processi palatini laterali*.

Alla decima settimana di sviluppo, i processi palatini si fondono medialmente tra loro e anteriormente col palato primario e col setto nasale, dando origine al palato secondario che separa definitivamente le fosse nasali dalla cavità buccale.

La lingua, che inizialmente occupava tutto lo stomodeo, si trova ora relegata nella cavità buccale. La linea di fusione dei processi palatini, al centro del palato secondario, costituisce il *rafe mediano*, mentre il punto d'incontro fra rafe e palato primario forma il *forame incisivo* (figura 1.4)



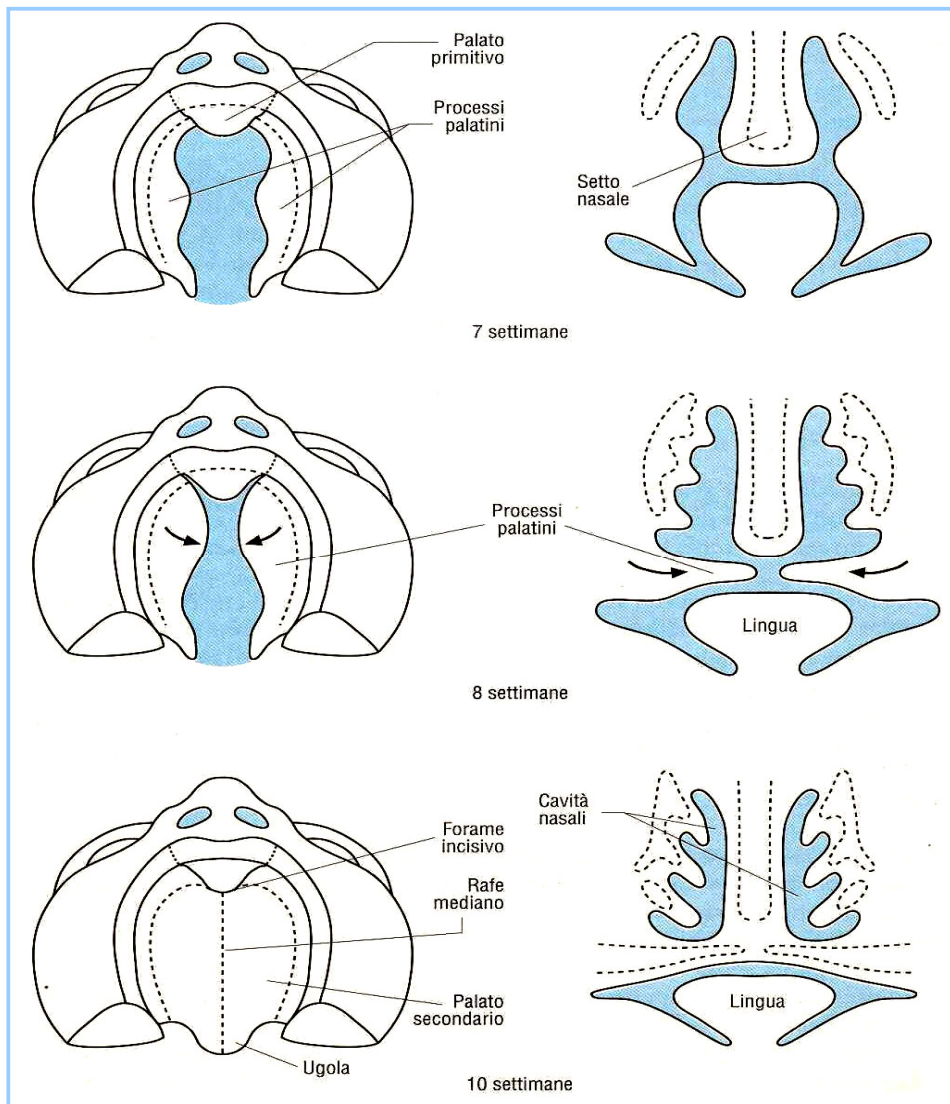


Figura 1.4 formazione del palato alla VII, VIII e X settimana di sviluppo embrionale

Il palato primitivo e la parte anteriore del secondario vanno incontro ad ossificazione membranosa, formando il *palato duro*. La parte posteriore non ossifica e forma il *palato molle* e l'*ugola*.

## ALTERAZIONI DELLO SVILUPPO DELLA FACCIA

Lo sviluppo della faccia coinvolge cinque processi facciali che accrescendo compiono complessi movimenti morfogenetici, infine confluiscono e fondono tra loro dando origine alle strutture definitive. Alterazioni di questi complessi eventi possono causare svariate malformazioni congenite. Le più comuni sono difetti di fusione dei processi mascellari che originano delle fessurazioni, le *labioschisi* o le *palatoschisi*. Le schisi labiopalatine (LPS) sono le malformazioni congenite orofacciali più importanti, sia per la frequenza con la quale si presentano nella popolazione umana, sia per i problemi funzionali, psicologici ed estetici ad esse correlati.

Tale malformazione, conosciuta anche come "labbro leporino", è determinata da una fessura più o meno estesa del labbro superiore e/o del palato primario, interessando o meno il palato secondario e molle, alterando la morfologia del volto.

Un neonato affetto da LPS presenta chiare difficoltà nell'alimentarsi; i problemi si aggravano ulteriormente nel bambino in cui risulta compromessa anche l'acquisizione della parola, con comprensibili conseguenze sullo sviluppo psico-intellettuale e sulle relazioni sociali.

Il trattamento di tale malformazioni è perciò complesso e di lunga durata e coinvolge diversi specialisti, quali pediatri, chirurghi plastici, ortodontisti, foniatrici e psicologi.

La labioschisi o "labbro leporino" è dovuta ad un difetto di fusione tra processo naso-mediale e processo mascellare. Si ipotizza che possa essere

dovuta ad una scarsa migrazione di cellule dalle creste neurale che vanno a formare il mesenchima della regione o ad una loro scarsa proliferazione. Lo scarso accrescimento impedirebbe l'avvicinamento dei processi, oppure se riuscissero ad approcciarsi causerebbe una debolezza nel ponte epiteliale tra le due strutture, dando luogo alla schisi.

Un'altra teoria sostiene che l'epitelio che copre il mesenchima dei processi, non vada incontro ad apoptosi e produca una barriera fisica alla fusione del mesenchima.

La labioschisi può essere *unilaterale* o *bilaterale*, a seconda che interessi un solo lato della faccia od entrambi.

Inoltre, può esser *semplice* o *completa*. Nel primo caso, la schisi non attraversa la gengiva, nel secondo, va dalle narici al forame incisivo.

La palatoschisi è causata da una mancata fusione dei processi palatini. Analogamente a quanto detto per le labioschisi, le cause sono da ricondursi ad un insufficiente avvicinamento per scarsa proliferazione cellulare o per un eccessivo allargamento della testa, oppure all'incapacità dei processi palatini di fondersi, dopo essere venuti a contatto.

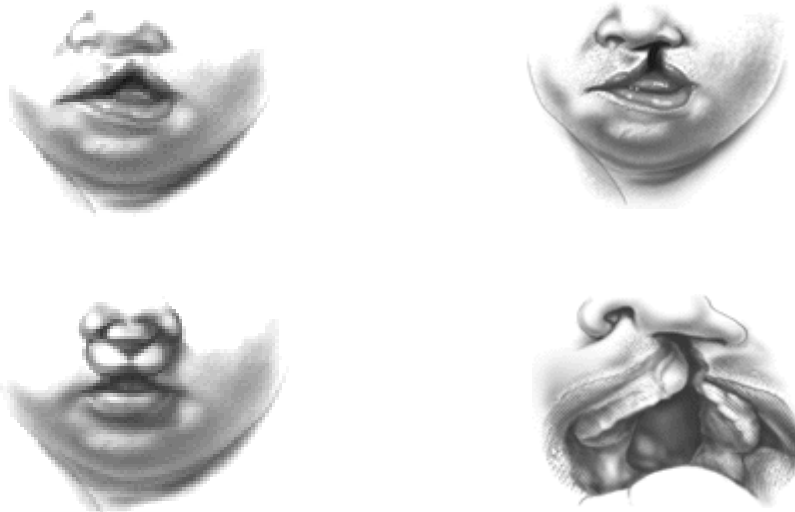
Frequentemente, la palatoschisi si associa alla labioschisi e porta alla schisi totale del palato, che interessa tutto il tetto della bocca fino alle narici.

Si parla di *palatoschisi totale monolaterale* se interessa un solo lato della faccia, oppure *palatoschisi totale bilaterale* se interessa entrambi i lati della faccia.

Da sottolineare che, nel caso di schisi di labbro l'eventuale presenza di schisi del palato è da considerarsi secondaria all'errore di chiusura del labbro. Molti

studi dimostrano infatti che, quando c'è un errore di chiusura del palato primario, c'è una crescita esuberante di tessuto prolabiale. Tale massa impedisce il movimento in avanti della lingua, che viene quindi deviata nella cavità nasale. L'ostruzione meccanica esercitata dalla lingua può ritardare i movimenti di uno o di entrambi i processi palatini laterali, determinando impedimento alla fusione del palato [Hemery 90].

#### SCHISI DEL LABBRO CON O SENZA SCHISI DEL PALATO



#### SCHISI DEL PALATO



Figura 1.5 Schema riassuntivo dei diversi tipi di schisi

## EPIDEMIOLOGIA DELLE SCHISI

L'incidenza delle LPS, per ciò che concerne la popolazione caucasica, varia da 1/700 a 1/1000 dei nati vivi [Fraser 1970, Bonaiti-Pellie 1982].

Le schisi possono essere suddivise in due grosse categorie: le schisi del solo palato, che coinvolgono il palato secondario(CPO), e le schisi del labbro che possono coinvolgere o meno il palato (CL/P). Questa distinzione risulta molto importante a livello biologico nonché necessaria considerando che il palato primario e il palato secondario si formano indipendentemente. Bisogna però, tener presente che è possibile trovare individui affetti da CPO in famiglie che presentano una storia di CL/P e viceversa [Ferguson 1988, Fraser 1970].

Un altro tipo di distinzione che può essere fatta, per ciò che concerne la CL/P, è quella tra casi familiari e casi sporadici ossia tra individui affetti che presentano o meno, all'interno della propria famiglia, altri individui affetti; anche se non possiamo essere sicuri che, tornando indietro nelle generazioni, si possa escludere del tutto la presenza di altri individui affetti.

La ricorrenza familiare della labiopalatoschisi non sindromica avvalora l'ipotesi che i fattori genetici, oltre a quelli ambientali, possano essere coinvolti nell'insorgenza di questa patologia. [Farral & Holder, 1992]

Gli studi epidemiologici mostrano come il rischio di avere un altro figlio affetto, per una coppia sana, aumenta di 45 volte se il precedente figlio risulta affetto; anche se questo valore può variare in relazione ad altri fattori, quali il numero di fratelli affetti, la gravità della malformazione, la prevalenza di schisi nella popolazione ed il sesso dell'individuo affetto. [Holder, 1991]

Il sesso gioca un ruolo molto importante nella ricorrenza della schisi, il rischio per fratelli di individui affetti aumenta fino al 5% nel caso in cui il probando sia femmina rispetto al 3.9% nel caso in cui il probando sia maschio. [Houdayer & Bahuau, 1998]

Considerando questi dati sono stati ipotizzati diversi modelli genetici. Il più indagato risulta essere il multifattoriale a soglia[Carter, 1969, Fraser, 1970], anche se, nella realtà, sono più d'uno i modelli ritenuti validi. Taluni ritengono più adatto quello multifattoriale in cui diversi geni aumenterebbero, ciascuno, il rischio di ricorrenza di sei volte. [Mitchell, 1992] Mentre altri vedono come più adatto il modello misto in cui è presente un solo gene maggiore che risulta essere in alcuni casi recessivo e in altri dominante.[Marazita, 1986; Hecht, 1991a]

## FATTORI AMBIENTALI

Numerosi studi hanno dimostrato l'importanza dei fattori non genetici nell'insorgenza della schisi.

In particolare sono stati valutati gli effetti dell'assunzione, da parte della madre, di farmaci durante il periodo periconcezionale in relazione alla possibilità di avere prole schisata.

Considerando il diffuso impiego dei corticosteroidi sono stati testati come possibili fattori di rischio nell'insorgenza della schisi, dimostrano come la loro assunzione aumenti, seppur in maniera dose dipendente, il rischio di prole affetta. [Carmichael and Shawn 1999, Park-Wyllie 2000]

Anche i farmaci anticonvulsivi, utilizzati per il trattamento dell'epilessia, fenitoina/idantoina, oxazolidinedione e acido valproico, sono stati testati, considerando il loro effetto teratogeno sull'embrione nelle prime settimane di gestazione. I risultati ottenuti mostrano come l'assunzione di questi farmaci aumenti il rischio d'insorgenza di difetti congeniti quali la schisi del labbro con o senza schisi del palato e altri gravi embriopatie riscontrate nella progenie di madri epilettiche in terapia.[Gorlin, 1990]

Anche l'utilizzo di Diazepam e di benzodiazepine in generale durante il periodo periconcezionale risulta associato all'insorgenza delle malformazioni orofacciali.[Safra & Oakley, 1975; Laegreid, 1990]

Partendo da questi risultati, anche il nostro gruppo di ricerca ha evidenziato una relazione tra l'insorgenza delle schisi e la subunità  $\beta 3$  di GABRB3 (recettore dell'acido gamma amminobutirrico), il quale è bersaglio delle benzodiazepine. [Scapoli, 2002]

Altri fattori ambientali sono legati allo stile di vita delle madri quali il consumo di alcool, il fumo o a carenze alimentari, in particolare vitaminiche.

L'intossicazione materno-fetale di etanolo da origine alla sindrome alcolica fetale, la quale presenta ritardo nella crescita e dismorfismo facciale. Una forte relazione è stata dimostrata, anche, tra consumo di alcool e presenza di schisi non sindromica, seppur in relazione con alla quantità assunta. [Werler 1991, Munger 1996, Shaw-Lammer 1999].

Il ruolo del fumo nell'insorgenza di patologie fetali è stato ampiamente studiato da numerosi autori, spesso con risultati conflittuali, ma per ciò che concerne la schisi è

generalmente accettato che il consumo di fumo in gravidanza aumenti l'incidenza di LPS. [Lief 1999]

Tra i fattori ambientali, che aumentano il rischio di schisi, si possono annoverare anche la carenza di acido folico e l'iperomocisteinuria, seppur i geni coinvolti nel loro metabolismo possono andare ad integrarsi in quella che è la componente genetica.

L'acido folico, meglio conosciuto come vitamina B9, fu scoperto nel 1930, non viene prodotto dall'organismo e deve quindi essere assunto attraverso il cibo, nel quale si trova principalmente nella forma metilata di 5-metiltetraidrofolato. Elementi ricchi di folato sono le verdure, alcuni tipi di frutta, il latte, i cereali, il lievito ed il fegato. Il fabbisogno quotidiano per un adulto è di circa 0.2 mg e raddoppia in gravidanza, visto che il feto attinge dalle riserve materne per il suo sviluppo. Il folato svolge un ruolo molto importante nelle prime fasi dello sviluppo embrionale. Infatti, una carenza di questo composto nei primi mesi di gravidanza, aumenta fortemente il rischio d'insorgenza di difetti di chiusura del tubo neurale (NTD), associati a spina bifida e anencefalia. La carenza di folato è un importante fattore di suscettibilità nell'insorgenza della labiopalatoschisi e, più in generale, è più alto il rischio di parto prematuro, di lesioni placentari e di ritardo nella crescita intrauterina.

Tutto questo perché la vitamina B9 è importante per la sintesi del DNA e delle proteine, e gioca un ruolo fondamentale nella formazione dell'emoglobina. Riveste inoltre un ruolo fondamentale a livello di quei tessuti che vanno incontro a processi di proliferazione e differenziazione, quali appunto i tessuti embrionali. Già



negli anni '40 Nelson osservò come in modelli animali la carenza di folato fosse causa di morte fetale [Nelson, 1950]

Alcuni fattori, inoltre, possono far aumentare il fabbisogno di tale vitamina o ridurre l'assorbimento, fra cui l'assunzione di alcuni farmaci (barbiturici, estrogeni), l'elevato consumo di alcool, specifiche varianti di geni coinvolti nel metabolismo del folato (MTHFR, recettori del folato).

## LOCI E GENI

Se consideriamo che circa il 20% dei pazienti affetti da schisi presenta un pregresso familiare è facile dedurre l'importanza della componente genetica in questa patologia, per questo motivo molti ricercatori hanno tentato di mappare i possibili geni coinvolti nell'eziologia della malformazione, impiegando studi di associazione e linkage.

Gli studi di associazione permettono di verificare una possibile relazione tra un gene noto ed una malattia paragonando le frequenze alleliche dei polimorfismi all'interno del gene stesso negli individui affetti e nei controlli sani.

L'associazione viene, quindi, dimostrata quando la frequenza dell'allele imputato risulta essere statisticamente più alta nei casi rispetto ai controlli, in quanto viene ereditato in associazione alla mutazione responsabile mappante nelle sue strette vicinanze. Questo tipo di studio si basa sul fatto che, in un'intera popolazione, la probabilità che le persone che presentano un certo allele ad un locus possiedano anche un determinato allele ad un secondo locus è del tutto casuale.

L'approccio utilizzato, invece, per gli studi di linkage prevede la ricerca di una correlazione tra la trasmissione familiare della malattia e la trasmissione di determinati marcatori a localizzazione nota.

Negli ultimi 15-20 anni sono stati pubblicati i risultati di numerosi studi genetici che avevano lo scopo di identificare geni o regioni cromosomiche coinvolte nell'insorgenza della schisi. In particolare le regioni 1q, 2p, 4q, 6p, 14q, 17q, e 19q sembrano contenere loci associabili alla malformazione, e vengono quindi denominati OFC (oro facial cleft); risulta piuttosto probabile che tutti questi loci contribuiscano in maniera diversa alla complessa eziologia della schisi.

Numerosi studi si sono proposti di investigare la regione, in seguito definita OFC1, situata sul braccio corto del cromosoma 6, alla ricerca di un gene responsabile della schisi; alla luce del fatto che aberrazioni cromosomiche che coinvolgono questa regione sono state riscontrate in pazienti con schisi [Kormann-Bortolotto 1990, Donnai 1992 ].

L'Analisi di linkage sulla popolazione italiana, condotto dal mio gruppo di ricerca, suggeriscono la presenza di un locus di suscettibilità alla schisi in 6p23-p24 [Carinci 1995]. Mentre, un'ulteriore analisi di linkage al locus HLA, mappante in 6p21.3, ha evidenziato a risultati contrastanti [Van Dyke, 1980; Watanabe, 1984]. Uno studio successivo, su 58 alberi genealogici di famiglie danesi con NSCLP, che proponeva un modello di ereditarietà autosomica dominante, ha testato la presenza di linkage con 42 marcatori polimorfici, ottenendo risultati significativi per tre marcatori: F13A in 6p23, ACP1 in 2p25 e PGD1 in 1p36. [Eiberg, 1987]

Indagini condotte su modelli animali mettono in evidenza il coinvolgimento del gene EDN1, codificante per l'Endotelina 1 e mappante in 6p24.1, con l'insorgenza

della labiopalatoschisi. Al contrario lo studio condotto sul gene ECE1, mappante in 1p36 e che codifica per un enzima in grado di effettuare un taglio proteolitico dell'Endotelina 1, esclude un suo ruolo nell'eziologia delle schisi labio palatine nell'uomo. [Pezzetti, 2000]

L'interesse per la regione 2p12, denominata in seguito OFC2, è nato dopo che è stata riportata associazione allelica tra RFLPs sul gene TGF $\alpha$  (Transforming growth factor alpha) e CL/P [Ardinger 1989] . Ulteriori analisi sul gene TGF $\alpha$  hanno dato risultati discordanti [Chenevix-Trench 1991, Chenevix-Trench 1992, Holder 1992, Sassani 1993, Stoll 1993, Jara 1995]. Un lavoro successivo dimostra come le varianti genetiche del gene TGF $\alpha$  in associazione con il consumo materno di fumo possano essere un fattore di rischio nell'insorgenza della schisi.[Shaw 1996]

Da uno studio, effettuato dal gruppo presso cui ho lavorato, è stato evidenziato linkage tra markers mappanti nell'OFC2 e CL/P [Pezzetti 1998], ma non tra TGF $\beta$  e la patologia, dando origine all'ipotesi che TGF $\beta$  sia solo un gene mappante molto vicino a OFC2 ma non il gene responsabile della patologia.

Più di uno studio ha verificato la presenza di linkage tra gli alleli del protooncogene BCL3, mappante in 19q13.2, e l'insorgenza di schisi [Stein, 1995 a; Amos, 1996; Wyszynski, 1997 a] e, più nello specifico, il nostro gruppo ha analizzato il marker polimorfico D19S574 strettamente legato a BCL3 evidenziando la presenza di linkage tra questo marcatore e la schisi.[Martinelli 1998] Aggiungendo questi dati a quelli ottenuti su PVR, situato in 19q, [Warrington 2006] risulta chiaro il motivo per cui questo locus sia stato inserito tra i loci d'interesse come OFC3.

La presenza di linkage tra marker mappanti sul braccio lungo del cromosoma 4 e CL/P ha indirizzato molti ricercatori sulla presenza di un locus di suscettibilità alla

schisi su quella regione [Beiraghi 1994], riducendo poi alla regione 4q25-4q31 [Mitchell, 1995]. Il gene non ancora identificato è stato denominato in via provvisoria OFC4.

Il gene OFC5, che mappa in 4q16, sembrerebbe corrispondere al gene MSX1. Nonostante i primi risultati negativi [Lidral 1997] studi successivi hanno dimostrato che il rischio di progenie con schisi, per mamme che consumano alcool o fumano durante la gravidanza, aumenta in relazione a determinate varianti alleliche del gene MSX 1 [Romitti 1999], ed evidenziato un possibile coinvolgimento in forme sindromiche che presentano schisi e agenesia dentale [Van den Boogaard 2000].

OFC6 viene identificato dal locus 1q32 ove mappa il gene IRF6. Il grosso interesse su questa regione deriva dal fatto che il gene IRF6 risulta correlato alla sindrome di Van der Woude e la sindrome dello pterigio polipteo, le quali annoverano tra i propri fenotipi la schisi. Partendo da questo presupposto diversi autori, tra cui anche il nostro gruppo, hanno dimostrato interesse nel possibile coinvolgimento di questo gene nelle forme non sindromiche di schisi. [Scapoli, 2005b; Blanton 2005].

La displasia ectodermica con labio-palatoschisi (CLPED1) è una forma sindromica che presenta, oltre alla schisi del labbro con o senza schisi del palato, displasia ectodermica, sindattilia e altri difetti alle mani e, in molti casi, ritardo mentale. Il gene PVRL1 risulta fortemente associato all'insorgenza di questa sindrome ed è stato, di conseguenza ipotizzato un suo coinvolgimento anche nella forma non sindromica della schisi. Da qui le successive indagini che hanno confermato questa ipotesi, permettendo di classificare il locus 11q23, in cui mappa il gene PVRL1, come OFC7 [Sozen, 2001; Scapoli, 2004; Scapoli, 2006; Turhani, 2005; Avila 2006].

Un'approccio molto simile è stato utilizzato per quel che riguarda OFC8, in quanto il gene TP63, codificante per la proteina tumorale p63, mappante in 3q28, è causa di diverse sindromi caratterizzate da schisi orofacciale [Ilanakiev 2000, Leoyklang 2006]. Per questa ragione si è quindi deciso di indagare eventuali mutazioni per questo gene anche nelle forme non sindromiche.

Per ciò che riguarda OFC9, le evidenze di associazione derivano da dei lavori fatti sulla popolazione indiana che mostrano associazione tra schisi e la regione 13q33.1-q34, oltre che la presenza di trisomia completa o parziale del cromosoma 13 in pazienti affetti da schisi.[Radhakrishna, 2006; Berge, 2001]

L'OFC10 si trova in corrispondenza del gene SUMO1, sul cromosoma 2 in posizione 2q33. L'interesse per questo gene nasce dalla sua funzione, codifica, infatti, per un fattore di trascrizione ubiquitario in grado di modificare numerose proteine cellulari e incidere sul loro metabolismo e funzione. Questo fa sì che SUMO1 partecipi a numerosi processi cellulari, come il trasporto nucleare, la regolazione trascrizionale, l'apoptosi, e il controllo della stabilità delle proteine [Su, 2002] e che competa con l'ubiquitina nella modificazione dell'antigene nucleare di proliferazione cellulare (PCNA) necessario alla replicazione e riparazione del DNA[Stelter, 2003]. Studi su modelli animali hanno inoltre mostrato l'espressione di questa proteina a livello del labbro superiore, del palato primario e mediale e del palato secondario, durante lo sviluppo embrionale del topo, confermando quindi il ruolo di SUMO1 nella formazione del palato [Alkuraya, 2006].

Recentemente, è evidenziata la capacità di SUMO1 di regolare il gene MSX1 [Gupta, 2006].

Non solo regioni cromosomiche ma anche singoli geni, nel corso degli anni, sono stati associati all'insorgenza della schisi.

In primis possiamo parlare del gene codificante per l'enzima metilentetraidrofolato reductasi (MTHFR) , il quale svolge un ruolo chiave nel metabolismo del folato. La mutazione C667T su questo gene, che dà origine ad una forma termolabile a ridotta attività dell'enzima [Frosst, 1995], risulta associato all'insorgenza delle schisi in diverse popolazioni. Senza considerare che una ridotta funzionalità dell'enzima dà luogo ad iperomocistenemia. [Tolarova, 1998; Mills, 1999; Gaspar, 1999; Wong, 1999]. Anche il gruppo presso cui lavoro ha indagato il gene MTHFR, nel 2001, dimostrando una maggiore frequenza per la mutazione C667T nelle madri di pazienti affetti da schisi, indicando un possibile effetto del genotipo materno per questo gene nell'insorgenza della patologia.[Martinelli, 2001]

Sulla base di questi dati positivi sono stati indagati altri geni facenti parte della via metabolica del folato dimostrando l'importanza di questo pathway nell'insorgenza della schisi.[Martinelli, 2006; Gaspar, 2004; Zhu, 2006; Motowska, 2006; Chevrier, 2007]

Diversi gruppi hanno dimostrato il coinvolgimento del gene TGFB3 (locus 14q24) nell'eziologia delle schisi labio-palatine. [Lidral, 1998; Maestri, 1997; Jugessur, 2003; Ichikawa, 2006] Anche il nostro gruppo di ricerca, quindi, ha indagato il coinvolgimento di questo gene ottenendo, però solo dei risultati borderline che non ci permettono di attestare con certezza il coinvolgimento di esso. [Scapoli 2002]

Studi condotti su modelli animali mostrano il ruolo che l'acido retinoico e il suo recettore RARA (locus 17q21.1) svolgono nello sviluppo della testa e nella

palatogenesi [Damm, 1993; Studer, 1994]. Le indagini che ne conseguirono diedero però risultati contrastanti [Chenevix-Trench, 1992; Shaw, 1993; Vintiner, 1993; Stein, 1995b; Kanno, 2002]

## SCHISI E SINDROMI

La schisi può presentarsi oltre che in forma isolata anche associata ad altre malformazioni, parlando quindi di forme sindromiche. Esistono più di 300 sindromi che presentano schisi orofacciali tra i propri fenotipi.

Lo studio delle sindromi che presentano schisi può risultare molto interessante allo scopo di far luce su geni che possono avere un coinvolgimento anche nella schisi isolata.

Partendo da questo presupposto le prime sindromi prese in considerazione furono la Displasia ectodermica con schisi e la sindrome di van der Woude, nello specifico sono stati indagati i geni PVRL1 e IRF6 causa di queste sindromi in relazione alla schisi isolata.

I risultati ottenuti per PVRL1 si sono dimostrati positivi in diverse popolazioni mostrandolo come fattore di rischio nell'insorgenza della schisi [Sozen, 2001; Avila, 2006; Scapoli, 2006; Scapoli, 2004]

Ancora più forte risulta essere l'implicazione IRF6 nell'insorgenza della labio palatoschisi non sindromica e numerosi sono gli studi ancora in atto [Jugessur, 2008, Scapoli, 2005 b; Zuccherò, 2004]

E' proprio alla luce di questi risultati positivi che ho deciso di procedere nella studio di geni responsabili di sindromi che presentano schisi, al fine di trovare possibili geni candidati nell'insorgenza delle forme isolate.

In particolare ho considerato due sindromi L'Ectrodattilia, displasia ectodermica con schisi (EEC) e la sindrome di Opitz (OS).

Le displasie ectodermiche sono più di 150 diverse sindromi che mostrano diverse anomalie dei tessuti di origine ectodermica (come capelli, denti, unghie, ghiandole sudoripare e dita); quella di cui mi sono occupata, l'ectrodattilia, è una sindrome autosomica dominante che presenta schisi orofacciale. Lo studio di pazienti affetti da questa sindrome ha mostrato il coinvolgimento del gene TP63 nell'insorgenza della stessa, in quanto TP63 nel 98% dei pazienti risulta mutato. [van Bokhoven, 2002]

Il coinvolgimento di questo gene è ulteriormente dimostrato da studi su modelli animali che hanno mostrato come topi TP63 deficienti presentino difetti a livello dello sviluppo cranio facciale e degli arti, oltre che assenza dell'epitelio stratificato. [Sasaki, 2002; Koster, 2004 ]

Questo gene risulta inoltre coinvolto in un'altra displasia ectodermica presentante schisi, Ankyloblepharon (AEC) in quanto va a inibire la trans-attivazione di *Dlx3* che a sua volta partecipa alla cascata enzimatica che regola l'organogenesi ectodermica.[Radoja, 2007] Questa non è l'unica via di segnalazione su cui TP63 va ad influire, il suo prodotto è, infatti, un regolatore del pathway del fattore di crescita dei fibroblasti e delle proteine morfogenetiche dell'osso BMP2 e BMP7.[Laurikkala, 2006]



Già uno studio ha provato a verificare l'implicazione di TP63 in NSCLP andando a verificare la presenza di mutazioni all'interno del gene stesso in un gruppo di pazienti, il ridotto campione di studio non ha però prodotto risultati positivi [Barrow, 2002] anche se l'interesse verso questo gene e quelli regolati da esso rimane comunque alto.

E' da questo presupposto che ho deciso di spostare il mio interesse sul gene *JAG2*, l'espressione del cui prodotto, Jagged2, viene regolata proprio da *TP63*. [Sasaki, 2002] Jagged2 è un ligando per i recettori trans membrana della famiglia Notch, che sono essenziali per il normale sviluppo del palato [Jiang, 1998; Casey, 2006]

Oltre a ciò, sono state trovate delle rare varianti di sequenza per *JAG2* che potrebbero essere correlate all'insorgenza delle forme isolate di schisi, ipotesi che sembra avvalorata anche da studi di associazione familiare. [Vieira, 2005; Neiswanger, 2006]

Tornando poi alla sindrome di Opitz, la quale presenta oltre alla schisi labio-palatina ipertiroidismo e difetti a livello cardiaco, dell'apparato urogenitale e del tratto laringo-tracheo-esofageo, ho indagato il gene *MID1*. L'analisi genetica di pazienti affetto da OS mostra mutazioni a livello del gene *MID1*, che potrebbero produrre una ridotta funzionalità del suo prodotto, causando quindi la sindrome stessa. [Quaderi, 1997] *MID1* codifica, infatti per una proteina appartenente alla famiglia TRIM/RBCC, proteine composte di un dominio RING, uno o due motivi B-box e una regione spiralizzata, la cui funzione cellulare e il cui ruolo nella patogenesi della malattia non sono ancora stati determinati, come ancora non è stato verificato il suo possibile coinvolgimento nelle NSCLP.

## MYH14

Agli inizi del dottorato ho partecipato all'indagine sul gene della miosina 14 (MYH14). L'interesse su questo gene nasce dai risultati positivi ottenuti dal gruppo di ricerca presso cui ho lavorato, per il gene della miosina 9 (MYH9) [Martinelli, 2007] che codifica per la catena pesante della miosina non muscolare di tipo IIA, nell'insorgenza della CL/P.

MYH 14 codifica per la catena pesante della miosina non muscolare di tipo IIC e presenta l'80% di omologia con il gene MYH9. Interessante risulta anche la sua ubicazione, mappa infatti in posizione 19q13.2, che si trova all'interno di OFC3.

## CBS/BHMT

I meccanismi che vanno ad influire sul corretto sviluppo embrionale, e quindi anche sulla presenza/assenza di schisi sono numerosi, tra questi di particolare interesse sono le anomalie dei pathway metabolici del folato e/o metionina [Taparia 2007], anche se il meccanismo attraverso cui la supplementazione di folato a livello periconcezionale aiuti a diminuire il rischio di schisi sia ancora poco conosciuto.

L'importanza dell'acido folico è ben spiegata dalla sua necessità per la sintesi del DNA, la regolazione del ciclo cellulare, la crescita tissutale e la metilazione del DNA. [Morrison, 1998]

I meccanismi di metilazione sono molto importanti in quanto regolano in maniera molto precisa l'espressione genica, l'imprinting materno e paterno oltre che mantenere le corrette strutture cromosomiche; tutti eventi importanti a livello dello sviluppo embrionale. [Razin, 2005]

Una metilazione non corretta nel periodo embrionale, associata al silenziamento di importanti fattori di crescita, dovuti al livello di folato non corretto o ad un'espressione alterata di geni coinvolti nel ciclo dei metili, possono portare alla formazione non corretta della faccia, e quindi dare origine alla schisi.

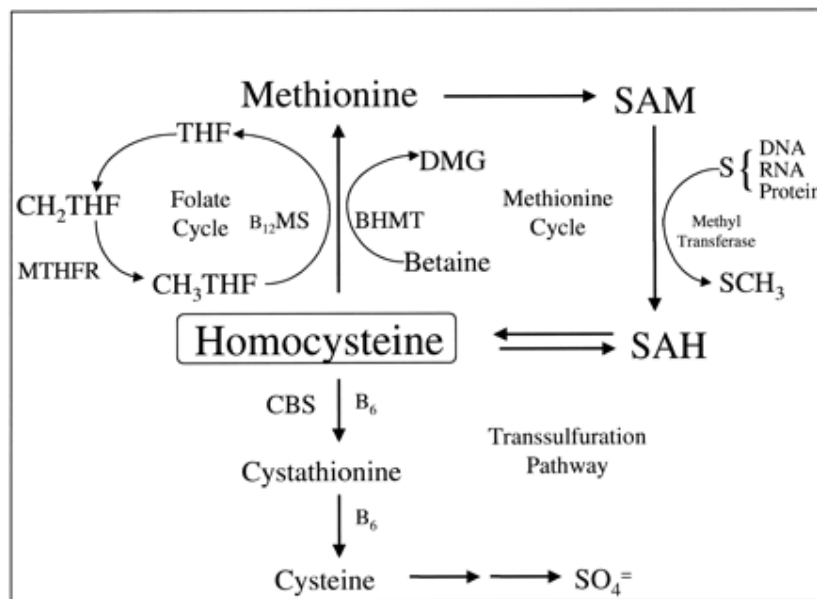


Figura 1.6 Schema riassuntivo delle vie di utilizzo dell'omocisteina

Nel processo di metilazione la molecola chiave è l'S-adenosil metionina (SAM) donatore di gruppi metile che si ottiene dal processo di rimetilazione dell'omocisteina in metionina, reazione catalizzata, nell'uomo, dall'enzima folato dipendente metionina sintasi (MTR) o dall'enzima citosolico betaina-omocisteina

metiltransferasi (BHMT) che è in grado di utilizzare la betaina come donatore di gruppi metili.

L'omocisteina viene però utilizzata anche in una via alternativa che prevede la sua transsolforazione in cistationina e cisteina, il cui primo step viene catalizzato dalla cistationina beta-sintasi (CBS), una liasi vitamina B6 dipendente in grado di generare cistationina dalla condensazione dell'omocisteina con la serina.

Il laboratorio presso cui ho effettuato il dottorato aveva precedentemente dimostrato come il genotipo materno del gene MTHFR, importante componente della catena del folato, possa influenzare il rischio di incidenza di CL/P nella progenie. [Martinelli, 2001; Pezzetti, 2004]. Partendo da questi risultati positivi sono stati indagati altri geni coinvolti nella catena del folato: i suoi recettori (FOLR1 e FOLR2), transcobalammina 1 e 2 (TCN1, TCN2), metionina sintasi (MTR), metionina sintasi reduttasi (MTRR); oltre che metilen tetraidrofolato deidrogenasi 1 (MTHFD1) sulla quale ho lavorato io stessa durante il mio internato di laurea.[Scapoli, 2005; Martinelli, 2006; Palmieri, 2008]. Ottenendo, da queste indagini, un'associazione significativa con CL/P per l'allele più frequente del polimorfismo C776G del gene TCN2. [Martinelli, 2006]

Considerando queste precedenti verifiche sul coinvolgimento del metabolismo folato dipendente dell'omocisteina nell'insorgenza di CL/P ho deciso di andare a verificare anche l'eventuale coinvolgimento dei geni BHMT, BHMT2 e CBS durante il dottorato di ricerca, in quanto responsabili di tre passaggi fondamentali nel metabolismo della metionina.

I geni BHMT e BHMT2 vengono considerati insieme in quanto presentano una forte omologia a livello amminoacidico, oltre che a mappare entrambi sul cromosoma

5q1.1-5q15. Per il gene BHMT sono precedentemente state evidenziate tre sostituzioni amminoacidiche (G199S, R29Q e Q406H), le quali però non sembrano presentare alcuna associazione con l'aumento a livello plasmatico dell'omocisteina. [Heil, 2000]

Il gene CBS, costituito da 23 esoni, mappa sul cromosoma 21 in posizione 21q22.3. Difetti a livello di questo gene possono portare ad una deficienza dell'enzima cistationina beta sintasi che porta a omocisteinuria.

## LMO4/MKX

La componente genetica nella schisi, come precedentemente spiegato, ha un ruolo molto importante, da qui l'esigenza di trovare sempre nuovi geni candidati da studiare. Date queste premesse, durante il mio soggiorno all'estero presso il laboratorio del Professor JC Murray, in Iowa City, ho indagato i geni MKX e LMO4.

A livello embrionale, nel topo, questo gene è espresso nel del mesenchima palatino durante la crescita e la fusione del palato stesso.[Anderson, 2006; Liu, 2006]

MKX, che viene anche descritto come *Irx1* (Irrquois homeobox protein-like 1), è localizzato sul braccio corto del cromosoma 10 (10p1), ricadendo all'interno della regione critica di 4.3 Mb responsabile dei topi mutanti Twirler (Tw). I topi eterozigoti per questa mutazione presentano danni all'orecchio interno, mentre in omozigosi schisi del labbro e del palato.[Liu, 2006]

Oltre a questo, la regione adiacente 10p11-15 risulta associata a schisi nel caso in cui sia duplicata, ma non se deleta suggerendo un possibile effetto posizione o dosaggio nell'insorgenza della patologia. [Brewer, 1999; Brewer 1998]

Per concludere, per il gene MKX è stata dimostrata una forte associazione con la schisi in due popolazioni scandinave. [Jugessur, 2009]

Il secondo gene indagato è LMO4 codificante per una proteina membro della sottoclasse LIM-only delle protein LIM domain. Questo gene, che svolge un ruolo nello sviluppo del tubo neurale, mappa sul cromosoma 1 (1p22.3).

LMO4 è, inoltre, un promotore della motilità e della migrazione cellulare [Sum, 2005], ciò suggerisce un suo possibile ruolo nella cicatrizzazione e nella chiusura di altri tessuti, come accade a livello labio-palatino durante lo sviluppo embrionale.

# SCOPO DELLA RICERCA

Le schisi labiopalatine sono le più comuni e facilmente riconoscibili malformazioni cranio facciali, in grado di ledere la morfologia e la funzionalità del volto.

La loro eziologia è molto complessa in quanto prevede il coinvolgimento di una componente genetica, come dimostrato dalla loro ricorrenza familiare nelle forme non sindromiche, e di una componente ambientale, determinata per lo più dalle abitudini della madre durante il concepimento (carenze vitaminiche, dieta, consumo di fumo, alcool e farmaci)

L'analisi effettuata, nel corso degli, sulla componente genetica ha portato alla luce più di 14 tra loci e geni, documentati in letteratura, coinvolti nell'insorgenza di questa patologia.

Lo scopo di questa ricerca, effettuata durante il triennio di Dottorato, è stato quello di selezionare possibili geni candidati e verificarne il loro possibile coinvolgimento nell'insorgenza della schisi, mediante studi di associazione in famiglie che presentano NSCLP.

Ho effettuato la selezione dei geni da indagare in base a determinate caratteristiche che essi presentavano, quali, il coinvolgimento in sindromi che presentano schisi, la posizione genomica, ruolo e coinvolgimento in specifici pathway biochimici del loro prodotto. In particolare i geni che ho selezionato ed indagato sono stati: MYH14, TP63, MID1, JAG2, BHMT, BHMT2, MKX e LMO4.



# MATERIALI E METODI

## Popolazione di studio

Per i progetti su cui ho lavorato il campione di studio utilizzato risulta composto da 239 triadi composte da padre, madre e probando affetto da schisi del labbro con o senza schisi del palato. Di questi 148 pazienti non presentano familiarità e vengono quindi considerati come casi sporadici mentre i restanti 91 presentano altri membri, all'interno della famiglia, affetti da schisi, e vengono quindi considerati casi familiari.

Tutti i probandi sono stati contattati in quanto afferenti a due grossi centri di trattamento delle schisi orofacciali, situati al Nord e al Sud Italia, che sono rispettivamente i reparti di chirurgia maxillofacciale dell'Ospedale di Vicenza e dell'Ospedale di Napoli.

Per tutti i campioni è stata effettuata un'attenta anamnesi familiare, al fine di escludere altre patologie somatiche o neurologiche e per documentare un'eventuale assunzione di farmaci, fumo e/o complessi multivitaminici nel periodo periconcezionale o durante la gravidanza stessa. Questa attenta selezione ha permesso di classificare tutti i probandi coinvolti nello studio come non sindromici.

Dopo aver ottenuto il consenso informato è stato prelevato un campione di sangue venoso periferico per ogni paziente e genitore, da cui in seguito ho estratto il DNA.

Per ciò che riguarda lo studio che ho effettuato durante il mio soggiorno all'estero il campione di studio è diverso. In particolare per lo studio dei due geni LMO4 e MKX, ho avuto a disposizione 1018 triadi, composte da padre, madre e figlio

affetto, provenienti dalle Filippine, e 345 triadi di popolazione caucasica residente in Iowa (U.S.A.). L'intero campione è stato utilizzato per l'analisi di associazione con gli SNP, mentre solamente una parte è stata utilizzata per il sequenziamento.

## Estrazione del DNA

L'estrazione del DNA è stata effettuata partendo da campioni di sangue periferico prelevati agli individui disposti a collaborare e facenti parte del campione di studio: probando e genitori in prima istanza ed eventualmente altri familiari. Per il mio studio ho utilizzato solo i campioni componenti le triadi probando, madre e padre; la presenza di campioni, appartenenti ad altri componenti della famiglia, è giustificata dal fatto che nel laboratorio, presso il quale ho lavorato, vengono eseguiti numerosi tipi di analisi, tra cui studi di linkage con calcolo del Lod Score, per i quali questi ulteriori campioni sono necessari.

Sono stati prelevati circa 10 ml di sangue venoso periferico, poi conservati a -20°C in presenza di EDTA come anticoagulante.

L'estrazione è stata effettuata secondo il protocollo di Higuchi (1989), che permette di eliminare i composti porfirinici derivati dall'eme, che interferiscono con l'attività della Taq Polimerasi durante la reazione di PCR.

## Scelta dei markers

Un polimorfismo a singolo nucleotide (Single Nucleotide Polymorphism , SNP) è una variazione, del materiale genico a carico di un unico nucleotide, tale per cui l'allele polimorfico risulta presente nella popolazione in una proporzione superiore all'1%. E' il marcatore genetico più frequente, in tutto il genoma, infatti, sono stati identificati più di dieci milioni di possibili SNP.

Tutte le informazioni utili sugli SNPs vengono raccolte da banche dati aggiornate che permettono la selezione dei marcatori più adatti ai propri scopi:

- **dbSNP** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>): database creato dal National Human Genome Research Institute in collaborazione con NCBI.
- **Orchid Biosciences, in Princeton, NJ**: la primaria compagnia commerciale che si occupa di confermare gli SNP nei database pubblici.
- **The SNP Consortium** (<http://snp.cshl.org/>): la più densa mappa di SNP del genoma umano, mantenuta aggiornata dal Cold Spring Harbor Laboratory.

In base alla natura del nucleotide coinvolto gli SNPs possono essere suddivisi in:

- Non codificanti: posizionati all'interno di un gene in regioni non trascritte 5' o 3' NTR, in regioni non tradotte 5' o 3' UTR, oppure intronici o trovarsi tra due geni (SNP intragenici).
- Codificanti: a loro volta suddivisibili in sinonimo (in grado di dare un cambiamento di codone ma non a livello amminoacidico) e non sinonimo (in grado di portare ad una variazione amminoacidica). Le mutazioni

derivanti vengono a loro volta chiamate sinonime e non sinonime. Le non sinonime si suddividono in:

□ Senso: a seconda se localizzate in un residuo essenziale o meno possono avere effetti più o meno gravi sulla funzionalità proteica.

□ Non senso: danno origine ad un codone di stop che produce una terminazione prematura della traduzione.

- Di non sostituzione: i tratta di polimorfismi non codificanti e sinonimi

In grado di alterare la funzionalità del gene, modificandone la regolazione trascrizionale o traduzionale, lo splicing, o andando ad intervenire sulla stabilità dell'RNA. Numerosi sono i casi in cui mutazioni a livello promotoriale sono associati a manifestazioni di tipo clinico.

La selezione degli SNPs più adatti per l'indagine di un determinato gene è stata effettuata valutando alcune proprietà di ogni singolo markers quali ad esempio:

- MAF (Minor Allele Frequency) ossia la frequenza, in una determinata popolazione, dell'allele più raro, questo è un requisito fondamentale nella scelta dei marcatori, infatti, la genotipizzazione di uno SNP in cui l'allele raro è troppo poco frequente può dare origine a dei dati in cui è difficile rilevare una sua variazione.
- l'eterozigosità, questo valore risulta molto importante quando si esegue, come nel mio caso, un TDT in quanto si effettua l'analisi su triadi che presentano almeno un genitore eterozigote, quindi un alto quantitativo di individui con genotipo eterozigote è auspicabile al fine di avere il maggior numero di triadi informative.

- eventuale variazione amminoacidica che lo SNP può comportare, nel caso in cui vi sia questa variazione, infatti, è possibile ipotizzare una ridotta funzionalità del prodotto genico che possa essere relazionabile all'insorgenza della patologia in esame. Sono quindi preferibili SNP non sinonimo in caso siano presenti.

A livello dello stesso gene possono essere presenti numerosi SNPs, molto spesso risulta impossibile o superfluo analizzare tutti questi polimorfismi. Per questo motivo viene selezionato un piccolo sottoinsieme di SNPs (tag SNPs) in grado di rappresentare al meglio il resto dei marcatori. A questo scopo viene utilizzato il software SNPs Tagger, il quale, indicando la regione cromosomica d'interesse, è in grado di selezionare questo sottoinsieme di SNPs più informativi.

Nella tabella seguente vengono riassunti gli SNPs indagati per ogni gene:

Gene	rs #	alleli	chr	banda	posizione sul cromosoma	tipologia	eterozigosità	Cambio amminoacidico
JAG2	rs7151594	C/T	14	14q32.33	105639041	5' al di fuori del gene	0.485	
JAG2	rs2238287	A/G	14	14q32.33	105618670	intronic	0.117	
JAG2	rs1057744	G/A	14	14q32.33	105617042	esonico	0.491	missenso E (GAG) --> K (AAG)
JAG2	rs909236	G/A	14	14q32.33	105606156	3' al di fuori del gene	0.511	
TP63	rs9842604	T/C	3	3q28	189372514	intronic	0.483	
TP63	rs9849766	T/C	3	3q28	189500313	intronic	0.432	
TP63	rs2176085	T/G	3	3q28	189570356	intronic	0.469	
TP63	rs9882348	C/A	3	3q28	189591357	intronic	0.499	
MID1	rs869917	C/T	X	Xp22.2	10525055	intronic	0.356	
MID1	rs2525073	T/C	X	Xp22.2	10505449	intronic	0.3	
MID1	rs5934910	G/A	X	Xp22.2	10458875	intronic	0.290	
MID1	rs869917	C/T	X	Xp22.2	10525055	intronic	0.356	
MYH14	rs671662	A/T	19	19q13.33	50710969	intronic	0.468	
MYH14	rs4801822	G/A	19	19q13.33	50726570	sinonimo A (GCG) --> A (GCA)	0.496	
MYH14	rs11670669	A/G	19	19q13.33	50751798	intronic	0.5	
MYH14	rs3745504	G/A	19	19q13.33	50771609	sinonimo L (CTG) --> L (CTA)	0.494	
MYH14	rs653584	G/A	19	19q13.33	50791355	intronic	0.472	
MYH14	rs7251148	T/G	19	19q13.33	50808749	intronic	0.492	
BHMT	rs3733890	A/G	5	5q14.1	78421959	esonico	0.401	missenso R (CGA) --> Q (CAA)
BHMT2	rs626105	A/G	5	5q14.1	78369901	intronic	0.433	
CBS	rs234713	G/A	21	21q22.3	44487891	intronic	0.318	
CBS	rs4920037	G/A	21	21q22.3	44481891	intronic	0.236	
CBS	rs5742905	T/C	21	21q22.3	44483184	esonico		missenso I (ATT) --> T (ACT)
MKX	rs7082165	G/T	10	10p12.1	27948659	3' al di fuori del gene	0.393	
MKX	rs11015938	C/T	10	10p12.1	27952779	3' al di fuori del gene	0.176	
MKX	rs2815547	C/T	10	10p12.1	27959544	3' al di fuori del gene	0.341	
MKX	rs17756619	A/T	10	10p12.1	27963687	3' UTR	0.356	
MKX	rs12411785	A/G	10	10p12.1	27967566	intronic	0.234	
MKX	rs2637276	A/G	10	10p12.1	27968654	intronic	0.388	
MKX	rs2815558	C/T	10	10p12.1	27975180	intronic	0.498	
MKX	rs2815560	A/G	10	10p12.1	27978030	intronic	0.348	
MKX	rs2451918	C/G	10	10p12.1	27987093	intronic	0.364	
MKX	rs16928202	A/T	10	10p12.1	27997669	intronic	0.467	
MKX	rs2492903	C/T	10	10p12.1	28043143	5' al di fuori del gene	0.436	
LMO4	rs2067921	T/G	1	1p22.3	87785597	3' al di fuori del gene	0.479	
LMO4	rs4488005	G/T	1	1p22.3	87790458	3' al di fuori del gene		
LMO4	rs3766027	G/A	1	1p22.3	87806800	intronic	0.376	
LMO4	rs6660709	A/T	1	1p22.3	87809749	intronic	0.302	
LMO4	rs1336945	C/T	1	1p22.3	87816722	5' al di fuori del gene	0.037	

Tabella A. Marcatori indagati per ogni gene

In combinazione con lo SNP rs5742905 ho tipizzato anche il polimorfismo 844\_845ins68, duplicazione di 68 bp a livello dell'esone 7 e 8 del gene CBS.

## Analisi dei polimorfismi mediante sonde fluorescenti

Una volta scelti i polimorfismi da indagare, ho proceduto selezionando la tecnica più efficace in base al numero di SNPs e al costo dell'analisi stessa.

La tecnica TaqMan risulta essere, seppur costosa, molto efficace per l'indagine degli SNPs in quanto riduce i tempi sperimentali.

La ditta Applied Biosystems, presso cui abbiamo acquistato lo strumento Sequence Detection System ABI PRISM 7500, fornisce numerosi saggi validati per l'analisi di SNPs noti.

Questa tecnica si basa sull'utilizzo di una coppia di primers e una coppia di sonde marcate con due fluorocromi diversi (VIC e FAM nel mio caso).

I primers servono per amplificare la regione contenete lo SNPs d'interesse e su cui andrà

a legarsi la sonda. Ogni sonda andrà legarsi solo in presenza della variante allelica specifica. Le sonde sono legate al fluorocromo specifico reporter in grado

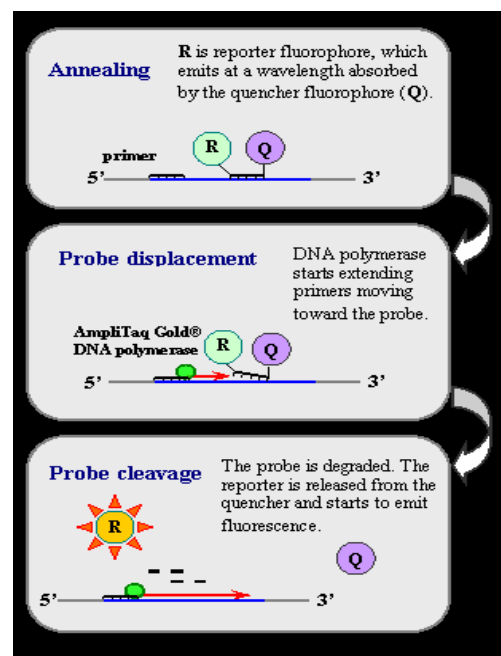


Figura 1.6 Schema riassuntivo del funzionamento delle sonde TaqMan



di emettere fluorescenza e ad un quencher in grado di assorbire questa fluorescenza. Durante l'elongazione del frammento di DNA contenente lo SNP verrà disgregata la sonda e quindi permessa la fluorescenza da parte del reporter specifico in quanto, una volta liberata dal quencher, non viene più assorbita. La fluorescenza viene poi rilevata dal detector e che ci permetterà di discriminare le varianti alleliche. In presenza di segnale da parte di un unico fluorocromo ci si troverà in presenza di un campione omozigote, mentre in presenza di segnale da parte di entrambi i fluorocromi si tratterà di un campione eterozigote.

Queste reazioni di amplificazione vengono allestite in un volume di 10 µl, per ogni campione, contenete 1 µl di DNA genomico, 5 µl di 2XTaqMan Universal PCR Master Mix (mix contenente tutti i componenti necessari per la riuscita della reazione e il fluoro cromo di riferimento che serve come taratura interna dello

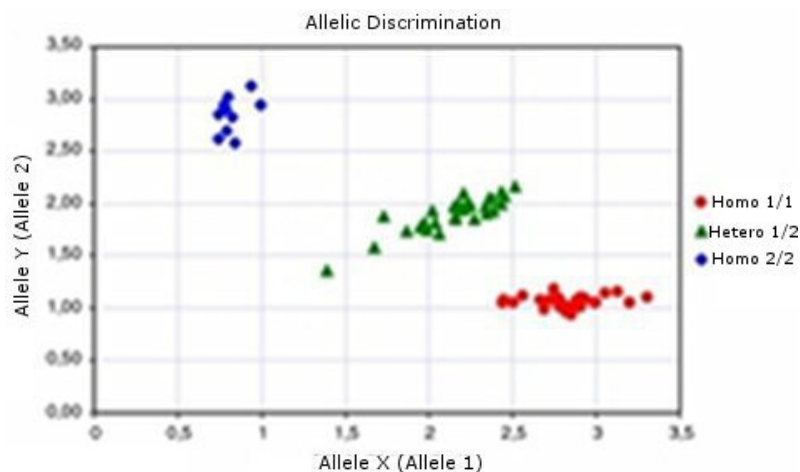


Figura 1.7 .Grafico relativo alla discriminazione allelica, i campioni vengono suddivisi in tre "nuvole" in relazione al genotipo. In blu e in rosso gli omozigoti per ciascun allele e in verde gli eterozigoti.

metodo TaqMan secondo il protocollo fornito dalla ditta Applied Biosystems.

strumento) e 0,2 µl di 40X SNP Genotyping Assay Mix (contenete la coppia di primers necessari per l'amplificazione e le sonde marcate). Le amplificazioni sono state realizzate utilizzando lo strumento Sequence Detection System ABI PRISM 7500 e il

I dati raccolti dallo strumento vengono analizzati mediante il software 7500 Software v2.0, che permette di visualizzare i grafici che mostrano l'andamento della fluorescenza, ad ogni ciclo di amplificazione, per ogni singolo campione. I risultati possono venire visualizzati anche in un grafico che permette la distinzione dei tre gruppi ogni uno dei quali rappresenta un determinato genotipo, come mostrato in figura 1.7.

## Analisi in manuale

Per quanto riguarda lo SNP rs5742905 del gene CBS, ho utilizzato un altro tipo di approccio sperimentale, in quanto, oltre alle varianti alleliche dello SNP ho valutato anche la presenza/assenza dell'inserzione di 68 bp.

Ho quindi deciso di procedere con un'amplificazione della regione d'interesse mediante PCR e visualizzazione su gel di agarosio dei prodotti di amplificazione. In base alla lunghezza del prodotto sono stata in grado di discriminare la presenza o meno dell'inserzione, mentre la digestione enzimatica degli amplificati, descritta nel paragrafo successivo ha permesso di tipizzare lo SNP rs5742905.

## *Analisi dei polimorfismi mediante enzimi di restrizione*

La digestione con enzimi di restrizione è una tecnica molto utile per lo studio di polimorfismi sul DNA. Quando un sito polimorfico, contenente una sequenza

consenso per un enzima di restrizione contiene uno SNP, è possibile identificare i due alleli in maniera differenziale verificando l'attività di taglio dell'enzima stesso. Quindi, una variante allelica dello SNP forma la sequenza riconosciuta dall'enzima di restrizione e l'enzima sarà in grado di riconoscerlo, al contrario la presenza dell'altra variante allelica distruggerà il sito di restrizione non permettendo l'attività dell'enzima.

L'enzima impiegato in questa ricerca è TspRI (New England Biolabs, Milan, Italy), in

grado di riconoscere il sito  $5'...NNCASTGNN\text{▼}...3'$   
 $3'...N\text{▲}NGTSA\text{C}NN...5'$ . Si tratta di un sito di restrizione degenere che prevede in alcune posizioni la presenza di nucleotidi diversi.

La reazione è stata eseguita in un volume totale di 10µl, con 1 unità di enzima in uno specifico tampone, in bagnetto termostato a 65°C per due ore.

In presenza della variante C al polimorfismo rs5742905 viene riconosciuta dall'enzima TspRI

Per la visualizzazione dei prodotti di digestione ho poi corso questi campioni su gel di poliacrilammide al fine di separare i frammenti di varia lunghezza.

I genotipi attesi nel saggio che tipizza contemporaneamente l'inserzione di 68 basi e l' rs5742905 sono riassunte nella tabella seguente:

bp	TT	CT	CC	68/68 TT/TT	68/68 CT/TT	68/68 CT/CT	68 TT/T	68 CT/T	68 TT/C	68 CT/C
<b>348</b>				-----	-----		-----		-----	
<b>280</b>	-----	-----					-----	-----		
<b>211</b>					-----	-----		-----		-----
<b>143</b>		-----	-----						-----	-----
<b>137</b>		-----	-----		-----	-----		-----	-----	-----

Tabella B. Genotipi attesi dall'analisi del marcatore rs5742905 in associazione con 844\_845ins68

## Sequenziamento

Per ricercare polimorfismi non descritti o identificare mutazioni responsabili delle schisi ho sequenziato le regioni esoniche di alcuni geni.

Ho disegnato mediante l'utilizzo del software Primer3 dei primers in grado di amplificare gli esoni (7 per MKX e 5 per LMO4) e le regioni fiancheggianti contenenti le sequenze segnale per lo splicing. I prodotti di PCR sono stati inviati alla ditta Functional Biosciences Inc per la reazione di sequenziamento. La ditta mi ha quindi fornito un file contenente le sequenze di ogni campione che ho visualizzato mediante l'utilizzo del software XMin. È stato condotto uno screening preliminare di 90 pazienti filippini e 90 dell'Iowa. In un secondo stadio, solo per gli esoni che presentavano variazioni, sono stati analizzati ulteriori 180 casi, 90 per ogni popolazione. Oltre ai pazienti sono stati sequenziati anche 95 controlli per la popolazione caucasica e 92 per la popolazione filippina.

L'impatto delle mutazioni non sinonime è stato valutato con il software PolyPhen (Polymorphism Phenotyping) in grado di predire l'impatto della sostituzione amminoacidica, sulla struttura e sulla funzione della proteina (<http://www.bork.embl-heidelberg.de/PolyPhen/>).

## ANALISI STATISTICA

Al fine di verificare il possibile ruolo, dei geni indagati, nell'insorgenza della schisi ho sottoposto i dati raccolti ad analisi statistica. Quest'ultima prevede di

sottoporre i genotipi raccolti alla verifica dell'equilibrio di Hardy Weinberg, nel caso in cui emergano delle deviazioni dall'equilibrio si verifica che quest'ultime non siano dovute ad un errore sistematico di genotipizzazione mediante l'utilizzo del test proposto da Wittke-Thompson. [Wittke-Thompson, 2005]

Dopo questa prima verifica ho eseguito l'analisi per il linkage disequilibrium e l'analisi degli aplotipi utilizzando il software TDTPHASE, parte del pacchetto UNPHASED versione 2.403. [Dudbrige, 2003]

### *Equilibrio di Hardy-Weinberg*

Questa legge, formulata indipendentemente dal matematico inglese Godfrey Hardy e dal medico tedesco Wiheln Weinberg nel 1908, è il principio più importante della genetica di popolazione.

Questa legge assume come rispettati i seguenti postulati:

- ✓ l'organismo in questione è diploide;
- ✓ le generazioni non si sovrappongono;
- ✓ l'accoppiamento è casuale, quindi la probabilità che un individuo si accoppi con un altro avente dato genotipo è uguale alla frequenza di tale genotipo nella popolazione;
- ✓ la popolazione deve essere sufficientemente ampia, teoricamente infinita;
- ✓ la migrazione è trascurabile;
- ✓ la mutazione può essere ignorata;

- ✓ non si deve verificare selezione naturale, cioè tutti i genotipi devono possedere le stesse capacità adattative e riproduttive.

Nel caso in cui queste assunzioni vengano rispettate, ci si attende che gli alleli si combinino nei diversi genotipi sulla base delle semplici leggi di probabilità e la popolazione si venga a trovare così in equilibrio di Hardy-Weinberg.

Tale equilibrio per un locus a due alleli può essere riassunto dall'equazione:

$$(p+q)^2 = p^2 + q^2 + 2pq$$

Dove:

p e q = sono le frequenze alleliche

$p^2$ ,  $2pq$ ,  $q^2$  = sono le frequenze dei genotipi

$p^2$  = è la frequenza del genotipo omozigote per l'allele con frequenza p

$q^2$  = è la frequenza del genotipo omozigote per l'allele avente frequenza q

$2pq$  = è la frequenza del genotipo eterozigote

Quindi una popolazione in equilibrio di Hardy-Weinberg presenta due caratteristiche:

- 1) il pool genico non si evolve per quel locus, quindi le frequenze alleliche non cambiano al trascorrere delle generazioni.
- 2) le frequenze genotipiche si troveranno nelle proporzioni  $p^2$ ,  $2pq$ ,  $q^2$  dopo una generazione di accoppiamenti casuali. Inoltre, le proporzioni genotipiche resteranno in tali proporzioni se saranno rispettate le condizioni richieste dalla legge di Hardy-Weinberg.

La legge è valida anche per loci a più alleli. In tal caso il nuovo equilibrio si ottiene dallo sviluppo del polinomio:

$$(p + q + r + \dots)^2$$

Per determinare se una popolazione è in equilibrio di Hardy-Weinberg si applica il test statistico del  $\chi^2$  (chi-quadrato), che permette di confrontare il numero di genotipi osservati con quello degli attesi e stimare se vi è una differenza che non è dovuta al caso, quindi se la popolazione non è in equilibrio di Hardy-Weinberg.

La formula che riassume questo test è la seguente:

$$\chi^2[g.l.] = \sum (O_i - A_i)^2 / A_i$$

dove  $O_i$  rappresenta la frequenza osservata nella classe  $i$ -esima e  $A_i$  è la frequenza attesa nella classe  $i$ -esima in base all'ipotesi formulata. I gradi di libertà (g.l.) si calcolano sottraendo una unità al numero di classi in cui è diviso il campione; sottraendo un ulteriore grado di libertà per ognuno dei parametri stimati per il calcolo del  $\chi^2$ .

Il  $\chi^2$  ottenuto dall'analisi dei dati sperimentali, viene confrontato con i valori tabulati, ai quali corrispondono determinate probabilità; nella tabella del  $\chi^2$ , per un solo grado di libertà, il valore di 3.841 corrisponde alla soglia di significatività del 5%, pertanto un valore di  $\chi^2$  uguale o maggiore di 3.841 può essere osservato, per effetto di deviazioni casuali, solo il 5% delle volte.

## *Transmission Disequilibrium Test (TDT)*

Il TDT è un test di linkage che dà risultati positivi quando gli alleli del marcatore sono in linkage disequilibrium con gli alleli al locus malattia. Più semplicemente, quando il test dà risultati positivi, si può affermare che l'allele malattia è vicino al marcatore considerato ed, in particolar modo, è più frequentemente associato ad un particolare allele di quest'ultimo. Viceversa, nel caso il test non restituisca risultati positivi, non permette di discriminare quale delle due condizioni, l'associazione o il linkage, sia venuta a mancare.

Questo saggio prende in considerazione solamente i nuclei famigliari con figli affetti ed almeno uno dei genitori eterozigote al locus marcatore.

Considerata la necessità di associazione allelica, si rende indispensabile l'utilizzo di marcatori situati nelle strette vicinanze del gene malattia, rendendo questo test adatto a testare solo geni candidati.

Si considerano i genitori eterozigoti e si conteggia il numero di volte che un allele è trasmesso ai figli affetti (B) e il numero di volte in cui viene invece trasmesso l'altro allele (C). Nell'ipotesi di indipendenza B dovrebbe equivalere a C. Per verificare se un'eventuale deviazione è significativa si utilizza il test del  $\chi^2$  calcolato con la seguente formula, imputando un grado di libertà:



$$\chi^2_{td} = (B-C)^2 / (B+C)$$

In presenza di più marcatori strettamente collegati si utilizza l'analisi degli aplotipi, dove per aplotipo si intende una combinazione di alleli a diversi siti polimorfici nello stesso cromosoma. Nel nostro caso i siti polimorfici sono SNPs.

L'analisi di linkage disequilibrium per gli aplotipi presenta le stesse caratteristiche dell'analisi di linkage per un singolo marcatore, senonché prevede l'assunzione per cui i marcatori, costituenti l'aplotipo, siano strettamente collegati e che non si sia verificata alcuna ricombinazione tra di essi.

### *Analisi log-linear*

Il modello log-linear è uno dei casi speciali dei modelli lineari generalizzati per i dati con una distribuzione poissoniana. L'analisi log-linear è un'estensione della tabella di contingenza a due vie in cui il rapporto condizionale tra due o più variabili discrete viene analizzato prendendo il logaritmo delle frequenze di cella di una tabella di contingenza.

Le variabili analizzate non vengono distinte tra variabili dipendenti e indipendenti, ma viene solo dimostrata la loro associazione.

# RISULTATI

## Geni responsabili di sindromi

Ho indagato 12 SNPs sui tre geni responsabili di sindromi con schisi (TP63, JAG2 e MID1) e tutti quanti rispettano l'equilibrio di Hardy-Weimberg.

I risultati ottenuti nell'analisi di associazione sono riassunti nella tabella di seguito:

Gene	dbSNP ID	MAF	T/NT	TDT P-value	Two SNPs P-value	Three SNPs P-value	Four SNPs P-value
JAG2	rs7151594	0.37	110/98	0.405	0.363	0.500	0.262
JAG2	rs2238287	0.32	109/97	0.403	0.271	0.020	
JAG2	rs1057744	0.47	130/105	0.103	0.011		
JAG2	rs909236	0.25	87/87	1.000			
TP63	rs9842604	0.45	97/106	0.528	0.883	0.481	0.323
TP63	rs9849766	0.32	85/87	0.879	0.439	0.575	
TP63	rs2176085	0.39	105/97	0.574	0.571		
TP63	rs9882348	0.42	112/108	0.787			
MID1	rs869917	0.43	63/52	0.305	0.391	0.279	
MID1	rs2525073	0.37	51/42	0.350	0.403		
MID1	rs5934910	0.34	45/51	0.540			

MAF      Minor Allele frequency

T/NT      Trasmessi/Non trasmessi

Tabella C. Risultati ottenuti dal TDT per i geni JAG2, TP63 e MID1.

L'analisi dei dati mediante il TDT ha evidenziato che nessuno dei polimorfismi analizzati mostra linkage disequilibrium con l'allele malattia.

Al contrario l'analisi della trasmissione degli aplotipi ha evidenziato un'associazione significativa per il gene JAG2; variazioni significative dalla distribuzione attesa sono state osservate quando si considerano i due marcatori rs1057744–rs909236 (p-value complessivo di 0.01) e i tre marcatori rs2238287–rs1057744–rs909236 (p-value complessivo di 0.02)

Alcuni aplotipi, hanno mostrato una deviazione significativa dalle leggi mendeliane, tra questi rs1057744-rs909236 A-G, che è stato trasmesso 40 volte e non trasmesso 73 volte (40/73, P-value = 0.003).

Da notare che rs1057744 è un polimorfismo non sinonimo che si traduce nel cambio amminoacidico Glu1905Lys nell'isoforma più lunga di JAG2 e Glu1791Lys nell'isoforma più corta.

Alla luce del fatto che MID1 è localizzato sul cromosoma X, ho testato le trasmissioni di alleli e aplotipi ai soli pazienti maschi. Questo perchè la condizione emizigote dei pazienti maschi potrebbe più facilmente determinare conseguenze fenotipiche. Per questa analisi sono state utilizzate 180 triadi, i risultati ottenuti hanno mostrato alterazione della distribuzione degli aplotipi dei polimorfismi rs2525073-rs5934910 con una significatività marginale (p-value complessivo = 0.051) e degli aplotipi di rs869917-rs2525073-rs5934910 (p-value complessivo = 0.041)

## MYH14

Per ciò che riguarda il gene della MYH14, l'analisi di associazione allelica e aplotipica ha prodotto i seguenti risultati:

db SNP ID	HWE P	T/NT	P-value	Two SNPsP-value	Three SNPsP-value
rs671662	0.26	83/86	0.82	0.78	0.86
rs4801822	0.01	114/128	0.37	0.79	0.81
rs11670669	0.75	102/98	0.78	0.43	0.07
rs3745504	0.16	97/79	0.17	0.17	0.46
rs653584	0.02	94/79	0.25	0.68	
rs7251148	0.01	103/92	0.43		

Tabella D. Risultati ottenuti dall'analisi di associazione allelica ed aplo tipica per il gene MYH14

I marcatori rs4801822, rs7251148 e rs653584 non rispettano l'equilibrio di Hardy-Weimberg. Nonostante ciò, dai risultati ottenuti, si evince che la trasmissione di alleli e aplotipi corrisponde all'atteso, indicando che e' indipendente dalla trasmissione della malformazione.

## *CBS/ BHMT/ BHMT2*

I risultati ottenuti per i tre geni appartenenti al pathway della metionina (CBS, BHMT e BHMT2) vengono trattati di seguito.

Il saggio utilizzato per genotipizzare la duplicazione 844\_845ins68 insieme allo SNP rs5742905, localizzato nella regione duplicata, ha mostrato che nella popolazione analizzata erano presenti solo due dei sei possibili aplotipi: la sequenza normale e la variante allelica C di rs5742905 nel segmento duplicato. Per questo motivo l'inserzione 844\_845ins68 e lo SNP insieme sono stati trattati nell'analisi statistica come fossero un singolo polimorfismo biallelico.

La verifica dell'equilibrio di Hardy-Weimberg, come mostrato nella tabella di seguito, evidenzia una deviazione significativa sia nelle madri che nei figli per il marker rs234713 del gene CBS:

marker	gene	gruppo	n	AA	Aa	aa	HWE
rs3733890	BHMT	padri	227	96	102	29	n.s.
rs3733890	BHMT	madri	232	100	100	32	n.s.
rs3733890	BHMT	figli	237	100	112	25	n.s.
rs626105	BHMT2	padri	226	156	66	4	n.s.
rs626105	BHMT2	madri	232	141	82	9	n.s.
rs626105	BHMT2	figli	238	153	72	13	n.s.
rs234713	CBS	padri	228	122	91	15	n.s.
rs234713	CBS	madri	232	115	109	8	0,003
rs234713	CBS	figli	238	124	104	10	0,038
833T>C/844_845ins68	CBS	padri	228	207	20	1	n.s.
833T>C/844_845ins68	CBS	madri	232	210	21	1	n.s.
833T>C/844_845ins68	CBS	figli	238	218	20	0	n.s.
rs4920037	CBS	padri	228	147	68	13	n.s.
rs4920037	CBS	madri	232	140	87	5	0,041
rs4920037	CBS	figli	238	144	91	3	0,006

Tabella E. Risultati ottenuti dalla verifica dell'equilibrio di Hardy-Weimberg per i geni BHMT, BHMT2 e CBS.

In entrambi i casi vi è un eccesso di eterozigoti. Questo tipo di deviazioni possono essere dovute ad un errore nella genotipizzazione, piuttosto che alla patologia ed ho , quindi, verificato quale fosse l'ipotesi corretta.

La distribuzione dei genotipi dei gruppi che mostrano deviazione (madri e figli) sono stati comparati con il gruppo di padri non affetti che mostrava una distribuzione in equilibrio. I risultati ottenuti vanno a supportare l'ipotesi per cui le

deviazioni dall'equilibrio siano dovute alla patologia piuttosto che a un errore nella genotipizzazione.

L'applicazione del TDT non supporta l'ipotesi di associazione tra marcatori e schisi, come mostra la tabella seguente:

marker	gene	T	NT	P value	Two SNPsP-value	Three SNPsP-value
rs3733890	BHMT	92	101	0,52	-	-
rs626105	BHMT2	77	65	0,31	-	-
rs234713	CBS	89	105	0,25	0,37	0,29
833T>C/844_845ins68	CBS	18	23	0,43	0,74	-
rs4920037	CBS	70	80	0,41	-	-

Tabella F. Risultati ottenuti dall' analisi di linkage per marcatori ed aplotipi nei geni BHMT, BHMT2 e CBS

Anche l'analisi degli aplotipi, non supporta quest'ipotesi.

Oltre al TDT standard, abbiamo implementato un modello log-linear per l'analisi caso-genitore che include parametri per verificare il potenziale effetto del genotipo dei figli, del genotipo materno e l'imprinting nell'eziologia della schisi.

Nessuna di queste ipotesi, o la combinazione delle stesse, risulta verificata per BHMT e BHMT2.

Per ciò che riguarda CBS, invece, I risultati ottenuti sembrano mostrare una possibile influenza nel rischio d'insorgenza della schisi da parte del genotipo materno e del figlio, in particolare per il marker rs4920037.

		rs234713		833T>C/844_845ins68		rs4920037	
Test	d.f.	$\chi^2$	P value	$\chi^2$	P value	$\chi^2$	P value
imprinting	1	0,62	0,43	0,00	0,98	0,45	0,50
figlio	2	4,64	0,10	2,54	0,28	6,89	0,03
madre	2	3,87	0,14	0,02	0,99	5,81	0,05
madre+figlio	4	8,52	0,07	2,56	0,63	12,75	0,01

Tabella G. Risultati ottenuti per i marcatori indagati per il gene CBS in relazione alle ipotesi di imprinting ed effetti dei diversi genotipi nell'insorgenza della schisi.

L'ipotesi dell'imprinting, al contrario, non risulta verificata.

## MKX/ LMO4

Per ciò che riguarda il lavoro effettuato presso il laboratorio del professor Jeff Murray, l'analisi preliminare del sequenziamento ha evidenziato, in alcuni campioni, variazioni di sequenza dei geni MKX e LMO4 nella popolazione filippina, riassunte nella tabella seguente:

Gene	esone	posizione	cambio nucleotidico	cambio amminoacidico
MKX	2	chr10:28,072,237	G/T	Arg / Ser
LMO4	1	chr1:87,569,942	G/T	Ala / Ser
LMO4	2	chr1:87,570,336	C/G	Ser / Cys

Tabella H. Risultati ottenuti dal sequenziamento preliminare dei geni MKX e LMO4

L'analisi delle mutazioni con il software Polyphen, che permette di predire l'impatto a livello proteico della mutazione, ha evidenziato come la mutazione



nell'esone 2 del gene MKX possa essere "probably damaging", suggerendone un possibile coinvolgimento nell'eziologia della schisi.

Un seguente approfondimento, in cui ho ampliato il campione indagato con altri soggetti affetti e con dei controlli sani, ha evidenziato le stesse mutazioni, in numero eguale, anche nei controlli, escludendo quindi che vi sia una relazione tra l'insorgenza della patologia e queste varianti .

L'analisi di linkage sui marcatori biallelici che ho indagato, per questi geni, non supporta l'ipotesi di associazione per i singoli markers con l'insorgenza della patologia.

L'analisi degli aplotipi, invece, mostra valori di significatività borderline, sempre per la popolazione filippina per gli aplotipi riassunti in tabella:

Gene	markers	aplotipo	p-value
MKX	rs12411785/rs2637276/rs2815558/rs2815560	G/G/C/G	0.012747
LMO4	rs2067921/rs4488005/rs3766027/rs6660709	T/T/G/T	0.051224
LMO4	rs4488005/rs3766027/rs6660709/1336945	G/A/T/C	0.041769

Tabella I. Risultati ottenuti dall'analisi di linkage per gli aplotipi dei geni MKX e LMO4

Per l'altra popolazione analizzata, la caucasica, non ho trovato alcun valore significativo in grado di giustificare un'ulteriore approfondimento.

# DISCUSSIONE

La schisi non sindromica del labbro con o senza coinvolgimento del palato è considerata una patologia ad eziologia complessa, che vede il coinvolgimento di fattori ambientali e fattori genetici. L'intenso lavoro di ricerca che vede impegnati numerosi centri internazionali ha permesso di identificarne alcuni, ma molto rimane ancora da fare per chiarire le basi molecolari della malformazione e per arrivare a concrete applicazioni cliniche, in termini di prevenzione, diagnosi precoce e ausilio alla cura.

L'identificazione delle cause genetiche delle NSCLP costituisce lo scopo delle ricerche che ho condotto nell'ambito del dottorato di ricerca. In particolare, gran parte del lavoro è consistito nell'identificare geni candidati e nel verificare il loro possibile coinvolgimento mediante studi di associazione in famiglie con NSCLP.

Gli studi di associazione sono uno strumento ideale per lo studio delle malattie ad eziologia complessa, al pari di quello che gli studi di linkage hanno rappresentato per l'identificazione dei geni responsabili delle malattie ad ereditarietà mendeliana semplice. Infatti, questa metodologia racchiude in sé diversi vantaggi, tra i quali l'essere efficace indipendentemente dal modello genetico alla base del fenomeno e per l'elevata sensibilità nel rilevare mutazioni che alterano anche lievemente il rischio di malattia. Per contro è necessario che gli alleli dei marcatori genetici utilizzati siano in linkage disequilibrium con l'allele malattia, condizione che si verifica soltanto se la distanza tra i loci in questione è piuttosto ridotta. Questo nel mio caso non costituisce un reale problema, in quanto l'approccio dei geni candidati permette l'utilizzo di marcatori intragenici.

Per la scelta dei geni da indagare ho utilizzato diverse strategie, basate ad esempio sul loro coinvolgimento in sindromi con schisi, sulla loro posizione

genomica, oppure perché codificanti proteine con particolari funzioni o che svolgono compiti in specifici pathway biochimici.

Un altro aspetto tecnico fondamentale nelle mie ricerche è stato la scelta del campione di studio. In particolare l'aver ristretto la selezione ai casi non sindromici (perché i casi sindromici sono più frequentemente riconducibili ad anomalie monogeniche o cromosomiche), provenienti da gravidanze con un decorso normale in madri che non avessero assunto farmaci teratogeni noti. Inoltre, è stato scelto di lavorare su triadi, paziente e genitori, per evitare tutte le problematiche legate alla selezione di un corretto campione di controllo. Infatti, i test di associazione basati sull'analisi di nuclei familiari utilizzano gli alleli trasmessi o non trasmessi dai genitori ai figli come fossero casi e controlli in uno studio di associazione classico. In altre parole i genitori degli individui affetti costituiscono contemporaneamente i casi e i controlli dello studio.

Una delle strategie che ho utilizzato per l'identificazione dei geni candidati, cioè putativamente coinvolti nell'insorgenza delle schisi non sindromi che è stata quella di considerare i geni che causano sindromi complesse che presentano schisi tra i propri tratti. L'idea è che mutazioni gravi possano determinare malformazioni multiple, mentre mutazioni lievi possano avere un impatto minore causando solamente uno dei tratti caratteristici, ad esempio la schisi del labbro o del palato. Questo è già stato descritto, ricordiamo che PVRL1 e IRF6, responsabili rispettivamente di CLPED1 e della sindrome di Van der Woude, risultano avere un'implicazione nelle schisi isolata non sindromiche. [Scapoli, 2004; Scapoli, 2005]

In particolare, ho focalizzato l'attenzione a due patologie, la EEC e la OS, causate rispettivamente dai geni TP63 e MID1. Oltre a questi due geni ho indagato il gene

JAG2 che viene modulato da TP63 e che è stato dimostrato essere indispensabile per un corretto sviluppo del palato nel topo. [Sasaki, 2002; Jiang, 1998] Inoltre, TP63 e JAG2 partecipano alla via di segnalazione Notch, necessaria alla formazione degli organi di origine ectodermica come gli epiteli palatini.

I risultati ottenuti indicano il coinvolgimento gene JAG2 nell'insorgenza della NSCLP nel campione analizzato. Anche se i singoli SNP non mostravano livelli di associazione significativi, l'analisi di associazione degli aplotipi ha supportato il ruolo di JAG2. L'apparente incongruenza dei risultati non sorprende particolarmente, in quanto anche su base teorica l'analisi aplotipica risulta essere più sensibile dell'analisi dei marcatori biallelici. Livelli di associazione simili sono stati ottenuti anche da precedenti ricerche condotte in altre popolazioni. [Vieira, 2005; Neiswanger, 2006] Complessivamente questi risultati indicano che mutazioni o polimorfismi di JAG2 sono in grado di alterare il rischio di sviluppare NSCLP.

Per contro, non ho trovato alcuna evidenza che supporti il coinvolgimento del gene TP63 nell'insorgenza della NSCLP, in quanto i polimorfismi indagati risultano non associati alla malformazione. Risultati negativi in uno studio di associazione non implicano automaticamente che il gene studiato non abbia un ruolo nella malattia. Questa è solo una delle ragioni possibili. Svariate situazioni alternative possono spiegare l'assenza di associazione, ad esempio che esistano un certo numero di mutazioni del gene, ognuna associata a diversi alleli dei marcatori, oppure che la mutazione abbia un bassissimo impatto nel rischio di NSCLP, rilevabile solo con campioni di studio ad elevatissima numerosità, o ancora che le eventuali mutazioni siano relativamente rare e quindi siano responsabili di un numero ridotto di casi. Lo screening di mutazioni a livello del gene TP63 supporta

quest'ultima ipotesi, infatti sono state riscontrate alterazioni in un numero ridottissimo di pazienti.[Barrow, 2002, Leoyklang, 2006]

Dati interessanti sono emersi anche nell'analisi dei polimorfismi del gene MID1, responsabile della OS. Ho osservato che la trasmissione di determinati aplotipi ai pazienti di sesso maschile era alterata. Questo dato è particolarmente significativo in considerazione del fatto che MID1 mappa sul cromosoma sessuale X, presente in singola copia nei maschi. Quindi la condizione emizigote potrebbe determinare un sensibile aumento di rischio, cosa che invece potrebbe non verificarsi nelle femmine eterozigoti. Questi risultati costituiscono una novità e considerando i livelli di significatività ottenuti nell'analisi statistica sono da considerarsi ancora preliminari; ulteriori indagini sono necessarie al fine di confermare il ruolo di MID1 nell'insorgenza delle schisi non sindromiche.

Due ragioni convergenti mi hanno indotto ad indagare il gene MYH14, codificante per la catena pesante della miosina non muscolare di tipo IIC. La prima è che presenta una forte omologia con il gene MYH9 che è tra i geni aventi un maggior impatto nell'insorgenza delle NSCLP, la seconda è che mappa sul braccio lungo del cromosoma 19, esattamente nella regione candidata denominata OFC3. [Martinelli, 2007]

I risultati ottenuti negano l'ipotesi di associazione tra i polimorfismi di MYH14 e la NSCLP, quindi non supportano il coinvolgimento di questo gene nell'insorgenza della patologia. Resta da chiarire il motivo che giustifichi la deviazione dall'equilibrio di Hardy-Weinberg riscontrata per i marcatori rs4801822, rs653584 e rs7251148.

Come ampiamente descritto, la schisi è una patologia complessa, risultato dell'interazione tra componenti genetiche e fattori ambientali.

Tra i fattori non genetici, l'alimentazione e l'apporto vitaminico costituiscono aspetti importanti. In particolare la supplementazione in gravidanza di acido folico riduce il rischio di alcune malformazioni congenite incluse le schisi. Per questo motivo, la via biochimica dipendente dall'apporto di folato è stata considerata critica nello sviluppo oro facciale e i geni codificanti gli enzimi che la compongono possibili fattori genetici delle schisi. In quest'ottica il nostro gruppo di ricerca aveva già indagato alcuni come: MTHFR, MTR, MTRR, TCN1 e TCN2. [Martinelli, 2006]

Ho quindi voluto estendere l'indagine ai geni BHMT, BHMT2 e CBS.

I risultati non hanno evidenziato prove che sostengano un ruolo dei geni BHMT e BHMT2 nell'insorgenza delle schisi labio-palatine.

Già in passato è stata evidenziata una distorsione nella trasmissione nei degli alleli del polimorfismo 844\_845ins68, in un campione di 234 triadi italiane. [Rubini, 2005]

Ho indagato lo stesso polimorfismo, in combinazione con rs5742905 (T833C), uno SNP localizzato all'interno della duplicazione, in aggiunta ad altri due SNP intronici al gene.

I risultati che ho ottenuto mostrano la presenza dell'allele raro del polimorfismo rs5742902 solo in presenza della variante con inserzione; già altri autori hanno precedentemente evidenziato la presenza di linkage disequilibrium tra questo allele e il segmento duplicato di 68 paia di basi. [Sebastio, 1995; Vyletal, 2007]

I test di associazione condotti su questi due ultimi polimorfismi non hanno evidenziato una loro correlazione con il locus malattia, al contrario del terzo SNP.

Infatti, il genotipo eterozigote per rs4920037 nelle madri e nei figli affetti influenza il rischio di schisi. Tali risultati sono in accordo con l'evidenza che una corretta espressione di CBS sia necessaria per ottenere un ambiente ottimale allo sviluppo dell'embrione. [Guzman, 2006]

Si può quindi speculare che CBS possa modificare il rischio di schisi agendo sia come fattore genetico nel controllo della rimetilazione della metionina a livello embrionale, che a livello materno, modificando la recettività uterina.

Non possiamo comunque considerare le varianti indagate come mutazioni funzionali, in quanto probabilmente rappresentano un polimorfismo neutro in linkage disequilibrium con la vera variante causale, tuttavia risultano interessanti ulteriori indagini.

Nel periodo di formazione all'estero presso i laboratori del professor JC Murray (University of Iowa), ho indagato due nuovi geni candidati: MKX e LMO4.

Il primo è stato selezionato in base ad uno studio che dimostrava associazione tra il gene MKX e la schisi nel tentativo di replicare e validare i dati precedentemente ottenuti.[Jugessur, 2009] Ulteriori dati, riguardanti la funzione del prodotto di MKX e informazioni dal modello murino, supportano l'importanza di MKX nello sviluppo orofacciale.

Nelle forme più lievi, o microforme, la schisi si presenta come cicatrici color vermiglio. [Gorlin, 2001; Eppley, 2005] Lo studio di queste ultime, su modelli murini, ha dimostrato come possano essere risultato di una "ricicatizzazione" della schisi in utero. [Liu, 2005 ;Liu, 2005] Nello spettro delle schisi si possono, inoltre, annoverare i difetti sub epiteliali al muscolo orbicularis oris (OOM), ancora meno



visibili delle microforme ma che risultano molto frequenti in persone con familiari che presentano schisi. [Castilla, 1995; Neiswanger, 2007]

L'altro gene indagato, LMO4, situato nel cromosoma 1 in posizione 1p22.3 codifica per una proteina membro della famiglia LIM-domain, necessaria per lo sviluppo del tubo neurale. Questo gene, agendo sinergicamente con Grhl3, e' in grado di favorire la migrazione delle cellule durante la fusione delle palpebre, e altri eventi morfogenetici come potrebbe essere la guarigione in utero della schisi.[Hahm, 2004, Ting, 2005; Sum, 2005, Hislop, 2008 ] Per lo studio di MKX e LMO4 il sequenziamento degli esoni è stato affiancato allo studio di associazione in quanto rappresenta un approccio complementare in grado di evidenziare mutazioni rare che possono essere determinanti in un numero ridotto di pazienti. Nella popolazione filippina, sono state evidenziati alcune nuove varianti di sequenza, che però sono state trovate in egual numero anche nei controlli non affetti. Ciò esclude il loro coinvolgimento nell'insorgenza delle schisi.

L'analisi di associazione degli SNP intragenici ha mostrato che i polimorfismi non sono correlabili a variazioni di rischio per la schisi nelle diverse popolazioni prese in esame. Abbiamo però ottenuto risultati ai limiti della significatività dall'analisi di associazione degli aplotipi in entrambi i geni in esame, nella popolazione filippina, ad indicare la possibile presenza di varianti eziologiche nelle porzioni di geni caratterizzate da specifici aplotipi. L'analisi degli aplotipi, mostra quindi come queste regioni possano meritare ulteriori indagini, in grado di individuare mutazioni eziologiche per la schisi, ad esempio mediante il sequenziamento di ulteriori pazienti limitatamente agli esoni compresi negli aplotipi associati.

# BIBLIOGRAFIA

Alkuraya F S, Saadi I, Lund J J, Turbe-Doan A, Morton C C & Maas R L (2006) **SUMO1 haploinsufficiency leads to cleft lip and palate.** *Science* 313:1751.

Amos C, Gasser D, Hecht J T (1996) **Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: new BCL3 information.** *Am J Hum Genet* 59 (3) 743—744

Anderson D M, Arredondo J, Hahn K, Valente G, Martin J F, et al. (2006) **Mohawk is a novel homeobox gene expressed in the developing mouse embryo.** *Dev Dyn* 235: 792-801.

Ardinger H H, Buetow K H, Bell G I, Bardaci J, Vandemark D R, Murray J C (1989) **Association of genetic variation of transforming growth factor alpha with cleft lip and palate.** *Am J hum Genet* 45: 384-353.

Avila J R, Jezewski P A, Vieira R, Orioli I M, Castilla E E, Christensen K, et al. (2006) **PVRL1 variants contribute to non-syndromic cleft lip and palate in multiple populations.** *Am J Med Genet A* 140:2562-70.

Barrow L L, van Bokhoven H, Daack-Hirsch S, Andersen T, van Beersum S E, Gorlin R, Murray J C (2002) **Analysis of the p63 gene in classical EEC syndrome, related syndromes, and non-syndromic orofacial clefts.** *J Med Genet* 39: 559–566.

Beiraghi S, Foroud T, Dlouhy S, Bixler D, Delohter-Blanchet D, Conneally P M, Hodes M E (1994) **Possible localization of major gene for cleft lip and palate to 4q.** *Clin Genet* 46: 255-256.

Berge S J, Plath H, Van De Vondel P T, Appel T, Niederhagen B, Von Lindern J J, et al. (2001) **Fetal cleft lip and palate: sonographic diagnosis, chromosomal abnormalities, associated anomalies and postnatal outcome in 70 fetuses.** *Ultrasound Obstet Gynecol* 18:422-31.

Blanton S H, Bertin T, Serna M E, Stal S, Mulliken J B, Hecht J T (2004) **Association of chromosomal regions 3p21.2, 10p13, and 16p13.3 with nonsyndromic cleft lip and palate.** *Am J Med Genet A* Feb 15;125A(1):23-7

Blanton S H, Cortez A, Stal S, Mulliken J B, Finnell R H & Hecht J T. (2005) **Variation in IRF6 contributes to nonsyndromic cleft lip and palate.** *Am J Med Genet A* 137A:259-62.

Bonaiti-Pellie C, Briard M L, Feingold J, Pavy B, Psaume J, Migne-Tufferand G, Kaplan J (1982) **An epidemiological and genetic study of facial clefting in France. I. Epidemiological and frequency in relatives.** *J Med Genet* 11:374-377

Brewer C, Holloway S, Zawalynski P, Schinzel A, FitzPatrick D (1998) **A chromosomal deletion map of human malformations.** *Am J Hum Genet* 63: 1153-1159.

Brewer C, Holloway S, Zawalynski P, Schinzel A, FitzPatrick D (1999) **A chromosomal duplication map of malformations: regions of suspected haplo- and triplolethality—and tolerance of segmental aneuploidy--in humans.** *Am J Hum Genet* 64: 1702-1708.

Carinci F, Pezzetti F, Scapoli L, Padula E, Baciliero U, Curioni C, et al. (1995) **Nonsyndromic cleft lip and palate: evidence of linkage to a microsatellite marker on 6p23.** *Am J Hum Genet* 56:337-9.

Carinci F, Scapoli L, Palmieri A, Zollino I, Pezzetti F (2007) **Human genetic factors in nonsyndromic cleft lip and palate: an update.** *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 71: 1509–1519

Carmichael S L, Shaw G M (1999) **Maternal corticosteroid use and risk of selected congenital anomalies.** *Am J Med Genet* 86: 242-244.

Carter C O (1969) **Genetics of common disorders.** *Brit Med Bull* 25: 52-57

Casey L M, Lan Y, Cho E S, Maltby K M, Gridley T, Jiang R (2006) **Jag2-Notch1 signaling regulates oral epithelial differentiation and palate development.** *Dev Dyn* 235: 1830–1844.

Castilla E E and Martinez-Frias M L (1995) **Congenital healed cleft lip.** *Am J Med Genet* 58 106–112

Chevenix-Trench G, Jones K, green A C, Martin N G (1991) **Further evidence for an association between genetic variation in transforming growth factor alpha and cleft lip with or without cleft palate.** (Letter) *Am J Hum Genet* 48: 1012-1013.

Chenevix-Trench G, Jones K, Green C, Duffy D L & Martin N G (1992) **Cleft lip with or without cleft palate: associations with transforming growth factor alpha and retinoic acid receptor loci.** *Am J Hum Genet* 51:1377-85.

Chevrier C, et al. (2007) **Fetal and maternal MTHFR C677T genotype, maternal folate intake and the risk of nonsyndromic oral cleft.** *Am J Med Genet A* 143 (3) 248—257.

Damm K, Heyman R A, Umesono K & Evans R M (1993) **Functional inhibition of retinoic acid response by dominant negative retinoic acid receptor mutants.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2989-93.

Donnay D, Heather L J, Sinclair P, Thakker Y, Scambler P, Dixon M J (1992) **Association of an autosomal dominant cleft lip and palate and translocation 6p23-9q22.3.** *Clin Dismorf* 1: 89-97.

Eiberg H, Bixler D, Nielsen L S, Conneally P M & Mohr J (1987) **Suggestion of linkage of a major locus for nonsyndromic orofacial cleft with F13A and tentative assignment to chromosome 6.** *Clin Genet* 32:129-32.

Eppley B L, van Aalst J A, Robrey A, Havlik R J and Sadove A M (2005) **The spectrum of orofacial clefting.** *Plast Reconstr Surg* 101e–114e.

Farral M, Holder S (1992) **Familial recurrence-pattern analysis of cleft lip with or without cleft palate.** *Am J Hum Genet* 52: 434-436.

Ferguson M W J (1988) **Palate development.** *Development* 103 Supplement, 41-60

Fraser F C (1970) **The genetics of cleft lip and palate.** *Am J Hum Genet* 22: 336-352.

Frosst P, et al. (1995) **A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase.** *Nat Genet* 10 (1) 111—113.

Gaspar D A, Pavanello R C, Zatz M, Passos-Bueno M R, Andre M, Steman S, et al. (1999) **Role of the C677T polymorphism at the MTHFR gene on risk to nonsyndromic cleft lip with/without cleft palate: results from a case-control study in Brazil.** *Am J Med Genet* 87:197-9.

Gaspar D A, et al. (2004) **Maternal MTHFR interacts with the offspring's BCL3 genotypes, but not with TGFA, in increasing risk to nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate.** *Eur J Hum Genet* 12 (7) 521—526

Giusti B, Comeglio P, Attanasio M et al. (1997) **Different distribution of the double mutant "T833C/68 bp insertion" in cystathionine beta-synthase gene in Northern and Southern Italian populations.** *Thromb Haemost* 78: 1293.

Gorlin R J, Cohen M M Jr, Levin L S (1990) **Syndromes of the head and neck.** Oxford University Press, New York

Gorlin R J, Cohen M M and Hennekam R C M (2001) **Orofacial Clefting Syndromes.** In: Bobrow M, Harper P S and Scriver C, Editors. *Syndromes of the Head and Neck.* Oxford University Press 850–860.

Gupta V , Bei M (2006) **Modification of Msx1 by SUMO-1.** *Biochem Biophys Res Commun* 345:74-7.

Guzman M A, Navarro MA, Carnicer R et al. (2006) **Cystathionine beta-synthase is essential for female reproductive function.** *Hum Mol Genet* 15: 3168-3176.

Hahm K, Sum E Y, Fujiwara Y, Lindeman G J, Visvader J E, Orkin S H (2004) **Defective neural tube closure and anteroposterior patterning in mice lacking the LIM protein LMO4 or its interacting partner Deaf-1.** *Mol Cell Biol* 24 2074–2082.

Hecht J T, Yang P, Michels V V, Buetow K H (1991a) **Complex segregation analysis of non syndromic cleft lip and palate.** *Am J Hum Genet* 49: 674-681.

Heil S G, Lievers K J, Boers G H et al. (2000) **Betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT): genomic sequencing and relevance to hyperhomocysteinemia and vascular disease in humans.** *Mol Genet Metab* 71: 511-519.

Hemery E H & Rimon D L (1990) **Principles and practice of medical genetic.** Churchill Livingstone.

Higuchi R (1989) **Simple and rapid preparation of samples for PCR. In: PCR technology) PCR technology.** New York: Stocton Press.

Hislop N R, Caddy J, Ting S B, Auden A, Vasudevan S, King SL, Lindeman G J, Visvader J E, Cunningham J M, Jane S M (2008) **Grlh3 and Lmo4 play coordinate roles in epidermal migration.** *Dev Biol Sep 1;321(1):263-72*

Holder S E (1991) **Cleft lip, is there light at the end of the tunnel.** *Arch of Dis in Child* 66: 829-832.

Holder S E, et al. (1992) **Confirmation of an association between RFLPs at the transforming growth factor-alpha locus and non-syndromic cleft lip and palate.** *J Med Genet* 29 (6) 390—392.

Houdayer C, Bahuau M (1998) **Orofacial cleft defects: inference from nature and nurture.** *Ann Genet* 41(2): 89-117.

Ilanakiev P, Kilpatrick M W, Toudjarska I, Basel D, Beighton P & Tsipouras P (2000) **Split-hand/split-foot malformation is caused by mutations in the p63 gene on 3q27.** *Am J Hum Genet* 67:59-66.

Ichikawa E, Watanabe A, Nakano Y, Akita S, Hirano A, Kinoshita A, et al. (2006) **PAX9 and TGFβ3 are linked to susceptibility to nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Japanese: population-based and family-based candidate gene analyses.** *J Hum Genet* 51:38-46.

Jara L, et al. (1995) **Association between alleles of the transforming growth factor alpha locus and cleft lip and palate in the Chilean population.** *Am J Med Genet* 57 (4) 548—551.

Jiang R, Lan Y, Chapman H D, Shawber C, Norton C R, Serreze D V, Weinmaster G, Gridley T (1998) **Defects in limb, craniofacial, and thymic development in Jagged2 mutant mice.** *Genes Dev* 12: 1046–1057.

Jugessur A, et al. (2003) **Variants of developmental genes (TGFA, TGFβ3, and MSX1) and their associations with orofacial clefts: a case-parent triad analysis.** *Genet Epidemiol* 24 (3) 230—239.

Jugessur A, Rahimov F, Lie R T, Wilcox J, Gjessing H K, Nilsen R M, et al. (2008) **Genetic variants in IRF6 and the risk of facial clefts: single-marker and haplotype-based analyses in a population-based case-control study of facial clefts in Norway.** *Genet Epidemiol* 32:413-24.

Jugessur A, Shi M, Gjessing H K, Lie R , Wilcox A J, Weinberg C R, Christensen K, Boyles A L, Daack-Hirsch S, Trung T N, Bille C, Lidral A C, Murray J C (2009) **Genetic determinants of facial clefting: analysis of 357 candidate genes using two national cleft studies from Scandinavia.** *PLoS One*. 4(4):e5385



Kanno K, Suzuki Y, Yang X, Yamada A, Aoki Y, Kure S, et al. (2002) **Lack of evidence for a significant association between nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate and the retinoic acid receptor alpha gene in the Japanese population.** *J Hum Genet* 47:269-74

Korman Bortolotto M H, Farah L M S, Soares D, Corbani M, Muller R, Adell A C A (1990) **Terminal deletion 6p23. A case report.** *Am J hum Genet* 37: 475-477.

Koster M I, Roop D R (2004) **The role of p63 in development and differentiation of the epidermis.** *J Dermatol Sci* 34: 3–9.

Laegreid L, Olegard R, Conradi N, Hagberg G, Wahlstrom J & Abrahamsson L (1990) **Congenital malformations and maternal consumption of benzodiazepines: a case-control study.** *Dev Med Child Neurol* 32:432-41.

Laurikkala J, Mikkola M L, James M, Tummers M, Mills A A, Thesleff I (2006) **p63 regulates multiple signalling pathways required for ectodermal organogenesis and differentiation.** *Development*. 133: 1553–1563

Leoyklang P, Siriwan P & Shotelersuk V (2006) **A mutation of the p63 gene in non-syndromic cleft lip.** *J Med Genet* 43:e28.

Lidral C, Murray J C, Buetow K H, Basart M, Schearer H, Shiang R, et al. (1997) **Studies of the candidate genes TGFB2, MSX1, TGFA, and TGFB3 in the etiology of cleft lip and palate in the Philippines.** *Cleft Palate Craniofac J* 34:1-6.

Lidral C, Romitti P A, Basart M, Doetschman T, Leysens N J, Daack-Hirsch S, et al. (1998) **Association of MSX1 and TGFB3 with nonsyndromic clefting in humans.** *Am J Hum Genet* 63:557-68.

Lieff S, Olshan A F, Werler M, Strauss R P, Smith J, Mitchell A (1999) **Maternal cigarette smoking during pregnancy and risk of oral clefts in newborns.** *Am J Epidemiol* Oct 1;150(7):683-94.

Liu W, Sun X, Braut A, Mishina Y, Behringer R R, Mina M and Martin J F (2005a) **Distinct functions for Bmp signaling in lip and palate fusion in mice.** *Development* 132; 1453–1461

Liu W, Selever J, Murali D, Sun X, Brugger S M, Ma L, Schwartz R J, Maxson R, Furuta Y and Martin J F (2005b) **Threshold-specific requirements for BMP4 in mandibular development.** *Dev Biol* 283; 282–293

Liu H, Liu W, Maltby K M, Lan Y, Jiang R (2006) **Identification and developmental expression analysis of a novel homeobox gene closely linked to the mouse Twirler mutation.** *Gene Expr Patterns* 6: 632-636.

Lonjou C, Zhang W, Collins A, Tapper W J, Elahi E, Maniatis N, et al. (2003) **Linkage disequilibrium in human populations.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6069-74.

Maestri N E, Beaty T H, Hetmanski J, Smith E A, McIntosh I, Wyszynski D F, et al. (1997) **Application of transmission disequilibrium tests to nonsyndromic oral clefts: including candidate genes and environmental exposures in the models.** *Am J Med Genet* 73:337-44.

Marazita M L, Spence M A, Melnik M (1986) **Major gene determination of liability to cleft lip with or without cleft palate: a multiracial view.** *J Craniofacial Genet dev Biol (suppl)* 2: 89-97

Martinelli M, et al. (1998) **Suggestive linkage between markers on chromosome 19q13.2 and nonsyndromic orofacial cleft malformation.** *Genomics* 51 (2) 177—181.

Martinelli M, Scapoli L, Pezzetti F, Carinci F, Carinci P, Stabellini G, et al. (2001) **C677T variant form at the MTHFR gene and CL/P: a risk factor for mothers?** *Am J Med Genet* 98:357-60.

Martinelli M, Scapoli L, Palmieri A, Pezzetti F, Baciliero U, Padula E, Carinci P, Morselli PG and Carinci F (2006) **Study of four genes belonging to the folate pathway: transcobalamin 2 is involved in the onset of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate.** *Hum Mutat* 27.

Martinelli M, Di Stazio M, Scapoli L, Marchesini J, Di Bari F, Pezzetti F, et al. (2007) **Cleft lip with or without cleft palate: implication of the heavy chain of non-muscle myosin IIA.** *J Med Genet* 44:387-92.

Mills J L, Kirke P N, Molloy M, Burke H, Conley M R, Lee Y J, et al. (1999) **Methylenetetrahydrofolate reductase thermolabile variant and oral clefts.** *Am J Med Genet* 86:71-4.

Mitchell L E, Risch N (1992) **Mode of inheritance of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: a reanalysis.** *Am J Hum genet* 51: 323-332.

Mitchell L E, Healey S C & Chenevix-Trench G (1995) **Evidence for an association between nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate and a gene located on the long arm of chromosome 4.** *Am J Hum Genet* 57:1130-6.

Morin I, Platt R, Weisberg I et al. (2003) **Common variant in betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) and risk for spina bifida.** *Am J Med Genet A*; 119A: 172-176.

Morrison H I, Ellison L F, Schaubel D, Wigle D T (1998) **Relationship of dietary folate and vitamin B6 with coronary heart disease in women.** *Jama* 280: 417-418; author reply 418-419.

Morton N E. (1955) **Sequential tests for the detection of linkage.** *Am J Hum Genet* 7:277-318.

Mostowska A., Hozyasz K.K., Jagodzinski P.P. (2006) **Maternal MTR genotype contributes to the risk of non-syndromic cleft lip and palate in the Polish population.** *Clin. Genet.* 69 (6) 512—517

Mostowska A, Hozyasz K K, Wojcicki P, Dziegielewska M, Jagodzinski PP (2009) **Associations of folate and choline metabolism gene polymorphisms with orofacial clefts.** *J Med Genet* Dec;47(12):809-15.

Munger R G, Romitti P A, Daack-Hirsch S, Burns T L, Murray J C, Hanson J ( 1996) **Maternal alcohol use and risk of orofacial cleft birth defects.** *Teratology* Jul;54(1):27-33.

Neiswanger K, Deleyiannis F W, Avila J R, Cooper M E, Brandon C A, Vieira A R, Noorchashm N, Weinberg S M, Bardi K M, Murray J C, Marazita M L (2006) **Candidate genes for oral-facial clefts in Guatemalan families.** *Ann Plast Surg* 56: 518–521; discussion 521.

Neiswanger K, Weinberg S M, Rogers C R, Brandon C A, Cooper M E, Bardi K M, Deleyiannis F W, Resick J M, Bowen A and Mooney M P et al. (2007) **Orbicularis oris muscle defects as an expanded phenotypic feature in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate.** *Am J Med Genet A* 143A 1143–1149.

Nelson M M, Asling C W, Evans H M (1950) **Congenital abnormalities in fetal rats resulting from pteroylglutamic (folic) acid deficiency during gestation.** *Anat Rec* 106: 309.

Nielsen D M, Ehm M G & Weir B S (1998) **Detecting marker-disease association by testing for Hardy-Weinberg disequilibrium at a marker locus.** *Am J Hum Genet* 63:1531-40.

Palmieri A, Masiero E, Martinelli M, Scapoli L, Pezzetti F, Caramelli E, Guidotti L, Carinci F (2008) **The MTHFD1 gene is not involved in cleft lip with or without palate onset among the Italian population.** *Ann Hum Genet* May;72(Pt 3):297-9.

Park-Wyllie L, Mazzotta P, Pastuszak A, Moretti M E, Beique L, Hunnisett L, Friesen M H, Jacobson S, Kasapinovic S, Chang D, Diav-Citrin O, Chitayat D, Nulman I, Einarson T R and Koren G (2000) **Birth defects after maternal exposure to corticosteroids: Prospective cohort study and meta-analysis of epidemiological studies.** *Teratology* 62: 385–392.

Pezzetti F, et al. (1998) **A locus in 2p13-p14 (OFC2), in addition to that mapped in 6p23, is involved in nonsyndromic familial orofacial cleft malformation.** *Genomics* 50 (3) 299—305.

Pezzetti F, Scapoli L, Martinelli M, carinci F, Brunelli G, Carls P, Palomba F, Gombos F, Carinci P, Tognon M (2000) **Linkage analysis of candidate endothelin pathway genes in nonsyndromic familial orofacial cleft.** *Ann Hum genet* 64: 341-343.

Pezzetti F, Martinelli M, Scapoli L, Carinci F, Palmieri A, Marchesini J, et al. (2004) **Maternal MTHFR variant forms increase the risk in offspring of isolated nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate.** *Hum Mutat* 24:104-5.

Quaderi N A, Schweiger S, Gaudenz K, Franco B, Rugarli E I, Berger W, Feldman G J, Volta M, Andolfi G, Gilgenkrantz S, Marion R W, Hennekam R C, Opitz J M, Muenke M, Ropers H H, Ballabio A (1997) **Opitz G/BBB syndrome, a defect of midline development, is due to mutations in a new RING finger gene on Xp22.** *Nat Genet* 17: 285–291.

Radhakrishna U, Ratnamala U, Gaines M, Beiraghi S, Hutchings D, Golla J, et al. (2006) **Genomewide scan for nonsyndromic cleft lip and palate in multigenerational Indian families reveals significant evidence of linkage at 13q33.1-34.** *Am J Hum Genet* 79:580-5.

Radoja N, Guerrini L, Lo Iacono N, Merlo G R, Costanzo A, Weinberg W C, La Mantia G, Calabro V, Morasso M I (2007) **Homeobox gene Dlx3 is regulated by p63 during ectoderm development: relevance in the pathogenesis of ectodermal dysplasias.** *Development* 134: 13–18.

Razin A, Kantor B (2005) **DNA methylation in epigenetic control of gene expression.** *Prog Mol Subcell Biol* 38: 151-167.

Romitti P A, Lidral A C, Munger R G, Daack-Hirsch S, Burns T L, Murray J C (1999) **Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate and maternal cigarette smoking and alcohol consumption. Evaluation of genotype-environment interactions from a population-based case-control study of orofacial clefts.** *Teratology* 59: 39-50.

Rubini M, Brusati R, Garattini G et al. (2005) **Cystathionine beta-synthase c.844ins68 gene variant and non-syndromic cleft lip and palate.** *Am J Med Genet A* 136A: 368-372.

Safra M J & Oakley G P Jr. (1975) **Association between cleft lip with or without cleft palate and prenatal exposure to diazepam.** *Lancet* 2:478-80.

Sasaki Y, Ishida S, Morimoto I, Yamashita T, Kojima T, Kihara C, Tanaka T, Imai K, Nakamura Y, Tokino T (2002) **The p53 family member genes are involved in the Notch signal pathway.** *J Biol Chem* 277: 719–724.

Sassani R, Bartlett S P, Feng H, Goldner-Sauve A, Haq A K, Buetow K H, Gasser D L (1993) **Association between alleles of transforming growth factor alpha locus and the occurrence of cleft lip.** *Am J Hum Genet* 45: 565-569.

Scapoli L, Martinelli M, Pezzetti F, Carinci F, Bodo M, Tognon M, et al. (2002) **Linkage disequilibrium between GABRB3 gene and nonsyndromic familial cleft lip with or without cleft palate.** *Hum Genet* 110:15-20.

Scapoli L, Palmieri A, Pezzetti F, Carinci F, Marchesini J, Martinelli M, et al. (2004) **Investigation of the W185X nonsense mutation of PVRL1 gene in Italian nonsyndromic cleft lip and palate patients.** *Am J Med Genet A* 127A:211.

Scapoli L, Palmieri A, Martinelli M, Pezzetti F, Carinci P, Tognon M, et al. (2005b) **Strong evidence of linkage disequilibrium between polymorphisms at the IRF6 locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate, in an Italian population.** *Am J Hum Genet* 76:180-3.

Scapoli L, Palmieri A, Martinelli M, Vaccari C, Marchesini J, Pezzetti F, et al. (2006) **Study of the PVRL1 gene in Italian nonsyndromic cleft lip patients with or without cleft palate.** *Ann Hum Genet* 70:410-3.

Sebastio G, Sperandio M P, Panico M, de Franchis R, Kraus J P, Andria G (1995) **The molecular basis of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency in Italian families, and report of four novel mutations.** *Am J Hum Genet* 56: 1324-1333.

Shaw D, Ray A, Marazita M & Field L (1993) **Further evidence of a relationship between the retinoic acid receptor alpha locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate (CL +/- P).** *Am J Hum Genet* 53:1156-7.

Shaw G M, Wasserman C R, Lammer E J, O'Malley C D, Murray J C, Basart A M, Tolarova M M (1996) **Orofacial clefts, parental cigarettes smoking and transforming growth factor-alpha gene variants.** *Am J Hum Genet* 58: 551-561

Shaw G, Lammer E J (1999) **Maternal periconceptional alcohol consumption and risk for orofacial clefts.** *J Pediatr* 134: 298-303

Sozen M A, Suzuki K, Tolarova M M, Bustos T, Fernandez Iglesias J E & Spritz R A (2001) **Mutation of PVRL1 is associated with sporadic, non-syndromic cleft lip/palate in northern Venezuela.** *Nat Genet* 29:141-2.

Stein J , Mulliken J B, Stal S, Gasser D L, Malcom S, Winter R, Amos C , Hecht J T (1995a) **Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: evidence of linkage to BCL3 in multigenerational families.** *Am J Hum Genet* 57: 257-272.

Stein J D, Hecht J T & Blanton S H (1995b) **Exclusion of retinoic acid receptor and a cartilage matrix protein in non-syndromic CL(P) families.** *J Med Genet* 32:78.

Stelter P, Ulrich H D (2003) **Control of spontaneous and damage induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation.** *Nature* 425 (6954) 188—191.

Stoll C, et al. (1993) **Genetic variation in transforming growth factor alpha: possible association of BamHI polymorphism with bilateral sporadic cleft lip and palate.** *Hum Genet* 92 (1) 81—82.

Studer M, Popperl H, Marshall H, Kuroiwa A & Krumlauf R (1994) **Role of a conserved retinoic acid response element in rhombomere restriction of Hoxb-1.** *Science* 265:1728-32.

Su H L, Li S S (2002) **Molecular features of human ubiquitin-like SUMO genes and their encoded proteins.** *Genetics* 296 (1—2) 65—73.

Sum E Y, Segara D, Duscio B, Bath M L, Field A S, Sutherland R L, Lindeman G J, Visvader J E (2005) **Overexpression of LMO4 induces mammary hyperplasia, promotes cell invasion, and is a predictor of poor outcome in breast cancer.** *Proc Natl Acad Sci USA* May 24;102(21):7659-64

Taparia S, Gelineau-van Waes J, Rosenquist T H, Finnell R H (2007) **Importance of folate-homocysteine homeostasis during early embryonic development.** *Clin Chem Lab Med* 45: 1717-1727.

Ting S B, Caddy J, Hislop N, Wilanowski T, Auden A, Zhao L L, Ellis S, Kaur P, Uchida Y, Holleran W M, Elias P M, Cunningham J M, Jane S M (2005) **A homolog of Drosophila grainy head is essential for epidermal integrity in mice.** *Science* 308, 411—413.



Tolarova M, Van Rooij I, M Pastor (1998) **A common mutation in the MTHFR gene is a risk factor for nonsyndromic cleft lip and palate anomalies.** *Am J Hum Genet* 63 p. 27.

Turhani D, et al. (2005) **Mutation analysis of CLPTM 1 and PVRL 1 genes in patients with non-syndromic clefts of lip, alveolus and palate.** *J Craniomaxillofac Surg* 33 (5) 301—306.

Van den Boogaard M J, et al. (2000) **MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans.** *Nat Genet* 24 (4) 342—343.

Van Bokhoven H & Brunner H G (2002) **Splitting p63.** *Am J Hum Genet* 71:1-13.

Van Dyke D C, Goldman S, Spielman R S, Zmijewski C M & Oka S W (1980) **Segregation of HLA in sibs with cleft lip or cleft lip and palate: evidence against genetic linkage.** *Cleft Palate J* 17:189-93.

Vieira A R, Avila J R, Daack-Hirsch S, Dragan E, Felix TM, Rahimov F, Harrington J, Schultz R R, Watanabe Y, Johnson M, Fang J, O'Brien S E, Orioli I M, Castilla E E, Fitzpatrick D R, Jiang R, Marazita M L, Murray J C (2005a) **Medical sequencing of candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate.** *PLoS Genet* 1: e64.

Vintiner G M, Lo K K, Holder S E, Winter R M & Malcolm S (1993) **Exclusion of candidate genes from a role in cleft lip with or without cleft palate: linkage and association studies.** *J Med Genet* 30:773-8.

Vyletal P, Sokolova J, Cooper D N et al. (2007) **Diversity of cystathionine beta-synthase haplotypes bearing the most common homocystinuria mutation c.833T>C: a possible role for gene conversion.** *Hum Mutat*; 28: 255-264

Warrington A, Vieira R, Christensen K, Orioli I M, Castilla E E, Romitti P A, et al. (2006) **Genetic evidence for the role of loci at 19q13 in cleft lip and palate.** *J Med Genet* 43:e26.

Watanabe T, Ohishi M & Tashiro H (1984) **Population and family studies of HLA in Japanese with cleft lip and cleft palate.** *Cleft Palate J* 21:293-300.

Weisberg I S, Park E, Ballman K V et al. (2003) **Investigations of a common genetic variant in betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) in coronary artery disease.** *Atherosclerosis*; 167: 205-214

Werler M M, Lammer E J, Rosenberg L, Mitchell A A (1991) **Maternal alcohol use in relation to selected birth defects.** *Am J Epidemiol* 134: 691-698.

Wyszynski D F, Maestri N, McIntosh I, Smith E A, Lewanda A F, Garcia-Delgado C, Vinageras-Guarneros E, Wulfsberg E, Beaty T H (1997a) **Evidence for an association between markers on chromosome 19q and non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in two groups of multiplex families.** *Hum Genet* Jan;99(1):22-6.

Wong W Y, et al. (1999) **Nonsyndromic orofacial clefts: association with maternal hyperhomocysteinemia.** *Teratology* 60 (1)253—257.

Zhu H, Curry S, Wen S, et al. (2005) **Are the betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT and BHMT2) genes risk factors for spina bifida and orofacial clefts?** *Am J Med Genet A* 135: 274-277

Zhu J, et al. (2006) **Variable contribution of the MTHFR C677T polymorphism to non-syndromic cleft lip and palate risk in China,** *Am J Med Genet A* 140 (6) 551—557.

Zuccherro T M, Cooper M E, Maher B S, Daack-Hirsch S, Nepomuceno B, Ribeiro L, et al. (2004) **Interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate.** *N Engl J Med* 351:769-80.